

Intérêt de la Réaction de Fixation du Complément pour le Diagnostic de l'Infection Grippale

(Application à l'étude de deux épidémies)

Travail du Laboratoire d'Hygiène
de la Faculté de Médecine de Lyon

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

et soutenue publiquement le 24 Novembre 1955

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

PAR

GINESTE Jean

*Elève de l'Ecole du Service de Santé Militaire
Diplômé de Sérologie
Certifié de Parasitologie Médicale et Technique*

Né le 25 Juin 1928

à PERPIGNAN (Pyrénées-Orientales)



LYON
NOIRCLERC & FÉNÉTRIER
3, rue Stella, 3

1955

**Intérêt de la Réaction
de
Fixation du Complément
pour
le Diagnostic de l'Infection Grippale
(Application à l'étude de deux épidémies)**

Intérêt de la Réaction de Fixation du Complément pour le Diagnostic de l'Infection Grippale

(Application à l'étude de deux épidémies)

Travail du Laboratoire d'Hygiène
de la Faculté de Médecine de Lyon

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

et soutenue publiquement le 24 Novembre 1955

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

PAR

GINESTE Jean

Elève de l'Ecole du Service de Santé Militaire

Diplômé de Sérologie

Certifié de Parasitologie Médicale et Technique

Né le 25 Juin 1928

à PERPIGNAN (Pyrénées-Orientales)



LYON

NOIRCLERC & FÉNÉTRIER

3, rue Stella, 3

1955

A LA MEMOIRE DE MA GRAND'MERE

A MES PARENTS

Ce travail leur est dédié, bien modeste
gage de gratitude pour les sacrifices con-
sentis.

A MA FEMME

dont l'aide me fut précieuse, faible témoi-
gnage de ma tendresse.

A MES FRERES ET A MA SOEUR

A MES BEAUX-PARENTS

A MES ONCLES ET TANTES

A TOUS CEUX QUI ME SONT CHERS

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DE THESE

MONSIEUR LE PROFESSEUR R. SOHIER

Membre Correspondant de l'Académie de Médecine

Il nous a accueilli dans son laboratoire où nous avons pu, pendant trois années, trop courtes à notre gré, admirer son immense culture et son labeur infatigable. Nous avons été particulièrement frappé de ses qualités humaines, tant au chevet du malade que vis-à-vis de ses collaborateurs.

A NOS JUGES :

MONSIEUR LE PROFESSEUR AGREGE P. GALY

MONSIEUR LE MAITRE DE CONFERENCES-AGREGE F. BENAZET

MONSIEUR LE PROFESSEUR AGREGE R. FRANÇOIS

Hommages respectueux.

A MONSIEUR LE DOCTEUR COUTURE

Docteur ès-sciences, chef de travaux

Il sait assortir d'une aide efficace sa
bienveillance souriante.

A MONSIEUR LE MEDECIN-COMMANDANT OLIVIER

ET MONSIEUR LE MEDECIN-COMMANDANT BELZ

*Spécialistes des Hôpitaux Militaires,
Chefs de service de l'Hôpital Militaire Des Genettes*

Ils nous ont appris que dermatologie et
ophtalmologie avaient aussi leurs maladies
à virus.

A NOS MAITRES DES HOPITAUX CIVILS ET MILITAIRES

A NOS MAITRES DE LA FACULTE

A MONSIEUR LE MEDECIN-GENERAL GIRAUD

*Professeur Agrégé du Val-de-Grâce,
Directeur de l'Ecole du Service de Santé Militaire
et de l'Hôpital Militaire d'Instruction Des Genettes*

A NOS CHEFS

A NOS CAMARADES DE L'ECOLE
DU SERVICE DE SANTE MILITAIRE

Intérêt de la Réaction de Fixation du Complément pour le Diagnostic de l'Infection Grippale

INTRODUCTION

La grippe est une cause importante de morbidité et parfois de mortalité chez l'homme puisque l'épidémie de 1918-1919 a causé la mort d'environ 20 millions de personnes. Sa gravité a attiré rapidement l'attention des biologistes. Un Comité a été créé dans le but d'enrayer ses effets : Le Centre Mondial de la Grippe (Londres), sous le contrôle de l'Organisation mondiale de la Santé. Fonctionnant comme « organisation de recherches » (ANDREWES), il coordonne les travaux des chercheurs du monde entier, dans le but de découvrir les meilleurs moyens de diagnostic, de traitement et de prophylaxie de cette infection.

Dans le cadre des recherches entreprises par le Professeur R. SOHIER au Laboratoire d'Hygiène de la Faculté de Médecine de Lyon; concernant le diagnostic et la prophylaxie des infections à ultra-virus, nous avons essayé d'apporter quelques confirmations aux notions actuellement acquises sur cette infection, par le moyen des méthodes biologiques spécifiques.

Après un bref historique des étapes de la connaissance de la maladie, nous donnerons un exposé rapide des conceptions actuelles sur la grippe, telles qu'elles se dégagent des travaux les plus récents.

Nous passerons ensuite en revue les différentes méthodes qui en permettent le diagnostic au laboratoire, en montrant, pour chacune d'elles, la part qui lui revient dans l'établissement de ces conceptions. Nous étudierons successivement :

— Méthodes biologiques spécifiques :

- Méthodes directes : Isolement du virus.
- Méthodes indirectes : Réactions sérologiques :
 - Réaction d'inhibition de l'hémagglutination ;
 - Réaction de fixation du complément ;
 - Autres méthodes sérologiques.

— Méthodes biologiques non spécifiques : Méthode cytologique.

Une telle étude ne pouvait être entreprise sans faire appel à de nombreuses collaborations. Nous devons à l'indulgence du professeur R. SCHIER, qui nous a inspiré le sujet, d'avoir pu, pendant trois ans, participer, de façon bien modeste, aux travaux que ce Maître incomparable dirige avec l'aide d'une équipe où nous avons trouvé des amis, plus que des chefs ou des collaborateurs.

Nous tenons à remercier très vivement le docteur E. COUTURE, chef de travaux, qui nous a si souvent soutenu de son expérience et de son optimisme, le docteur F. BENAZET, agrégé d'Hygiène et chef du Laboratoire de l'Hôpital Militaire Des Genettes, et le docteur J. THIVOLET, qui nous a accueilli au laboratoire en camarade.

Nous devons une gratitude toute particulière au docteur mademoiselle M.-M. PEILLARD qui nous a initié, avec beaucoup de patience, à la sérologie et la bactériologie et nous a convaincu de la rigueur nécessaire à leurs techniques.

Nous sommes redevable à toute l'équipe du laboratoire des résultats exposés dans ce travail, tant aux aides-techniques, Mlles F. CHALLUT et Y. CHARDONNET, qui ont assuré les ovocultures et l'expérimentation sur l'animal, qu'à Monsieur J. MAURETTE, aide de laboratoire spécialisé, qui ne nous a jamais laissé manquer de matériel.

Nous ne sommes pas près d'oublier l'ambiance de camaraderie dans laquelle nous avons travaillé, à la section de sérologie, aux côtés de Mademoiselle J. FREYDIER et de nos camarades d'Ecole G. FAVIER et GAVANOU.

Nos remerciements vont aussi au personnel du service des Contagieux de l'Hôpital Des Genettes, aux médecins des corps de troupe et au docteur OSSOLA, qui ont réuni les observations cliniques et pratiqué les prélèvements, ainsi qu'à mademoiselle Y. PONS, dont l'aide nous fut précieuse pour nos recherches bibliographiques.

Toutes ces recherches n'ont été rendues possibles que par l'équipement technique et les produits obtenus grâce aux crédits alloués par la Caisse Nationale de Sécurité Sociale.

HISTORIQUE

L'individualité de la grippe ne s'est dégagée que très progressivement au cours des siècles et il semble que bon nombre des « pestes » historiques n'aient été que des manifestations de cette maladie infectieuse décrite dès 1358 par le chroniqueur florentin Matteo VILLANI à propos d'une épidémie qui ravageait l'Italie et qui apparaissait sous « l'influenza d'un freddo ». Ailleurs, SAUVAGES la baptisait « Grippe », mettant l'accent sur la soudaineté de l'installation des symptômes, et, au cours du XVIII^e siècle, Rozoux l'appelait « petite peste ». Si cette multiplicité d'épithètes ne facilite pas sa reconnaissance dans les descriptions des siècles passés, une mortalité formidable, caractérisant les pandémies qui déferlèrent sur le monde de 1742 à 1918, a laissé dans la littérature des traces suffisantes pour en dégager les traits les plus caractéristiques.

L'époque des recherches étiologiques débute en pleine ère pasteurienne avec l'épidémie de 1899 que R. PFEIFFER attribue à « *Hemophilus influenzae* », étiologie non confirmée lors de la grande pandémie mondiale de 1918 où divers expérimentateurs montrèrent simultanément dans le monde la virulence des produits pathologiques filtrés sur bougie de Chamberland.

Mais la véritable étude expérimentale commence en 1933 lorsque les anglais SMITH, ANDREWES et LAIDLAW montrent la réceptivité au virus grippal du furet puis de la souris. On isole alors par ce moyen de nombreuses souches semblables à la première isolée (souche W. S.), jusqu'en 1940, où BURNET, de Melbourne, inaugurant la méthode de l'inoculation du virus à l'œuf de poule incubé, permet la mise en évidence, entre toutes les souches qui présentaient une immunité croisée complète avec cette souche W.S., de différences antigéniques notables. Toutes ces souches immunologiquement semblables furent appelées souches A.

La même année, FRANCIS et MAGILL, séparément, isolaient des souches ayant entre elles une immunité croisée mais n'immunisant pas contre les souches du groupe A, qui constituèrent le groupe B.

La découverte fortuite par HIRST, en 1941, de l'hémagglutination des hématies par le virus et son inhibition, spécifique du type, par un antisérum, apporte un moyen d'étude antigénique fine des souches qui vient confirmer les données précédentes et permet éga-

lement le diagnostic sérologique de l'affection, mis en œuvre dès 1936 par SMITH W., par l'application au diagnostic de la grippe de la méthode de fixation du complément de BORDET.

Jusqu'en 1947, toutes les souches de grippe isolées appartenaient soit au groupe A, soit au groupé B.

Mais, dès 1947, on isola un nombre croissant de souches qui, malgré leur parenté certaine avec le virus du groupe A, s'en différenciaient suffisamment par une partie de leurs caractères antigéniques pour justifier la création d'un groupe A prime ou FM1 ; mais ce groupe lui-même est constitué de souches dont aucune, d'une épidémie à l'autre, n'est strictement identique à l'autre, posant le problème d'une constante évolution des souches à partir d'un type initial.

Au contraire, une souche d'un type nouveau, isolée en 1950, s'est montrée totalement différente de toutes les souches jusque là isolées et a reçu le nom de souche C.

Les travaux de ces dernières années tendent, sous l'égide de l'O.M.S., à perfectionner les moyens d'étude des virus grippaux, à élucider le mécanisme de la propagation des épidémies et à parfaire la prophylaxie de l'infection par la mise en œuvre des thérapeutiques modernes et la préparation de vaccins.

CHAPITRE PREMIER

CONCEPTIONS ACTUELLES SUR LA GRIPPE

LA GRIPPE, ENTITE CLINIQUE ?

Il n'est pas d'exemple, dans la terminologie médicale, de termes plus abusivement employés que ceux de « grippe » et d'« état grippal ». La raison de cet abus réside dans l'allure clinique notablement variable de cette affection : Le médecin est alors tenté de porter ce diagnostic peu compromettant chaque fois qu'il hésite devant un ensemble de symptômes qui pourraient à la rigueur invoquer cette étiologie. Mais ces signes peuvent accompagner une quelconque affection des voies respiratoires supérieures : Le tractus respiratoire répond en effet de façon assez univoque à toute attaque par les nombreux micro-organismes capables de provoquer l'inflammation de sa muqueuse et les termes qui servent au médecin à préciser la localisation anatomique de cette inflammation, rhinite, pharyngite, laryngite, trachéite ou bronchite, ne sauraient malheureusement rien laisser préjuger de l'agent qui l'a provoquée. (STUART-HARRIS, 1953).

A. — DIFFICULTE DE RATTACHER DES MANIFESTATIONS CLINIQUES A LA GRIPPE.

1. Grippe commune et autres infections respiratoires :

Il n'est pas douteux qu'il existe une forme classique de la grippe caractérisée par une incubation courte (24 à 48 heures), installation rapide avec fièvre et signes neuro-musculaires, asthénie profonde allant parfois jusqu'à la lipothymie, installation secondaire des signes rhino-pharyngés et trachéo-broncho-pulmonaires avec congestion et catarrhe des muqueuses provoquant souvent des épistaxis ; évolution courte en 8 jours maximum avec courbe thermique souvent diphase (V grippal), les complications pulmonaires étant habituellement évitées par les antibiotiques. Mais ce

tableau évocateur est loin d'être la règle et il est souvent difficile de situer la grippe commune dans le cadre des autres infections du tractus respiratoire : elle peut parfaitement être confondue avec une angine banale, le coryza épidémique ou les infections aiguës indifférenciées classées par les anglo-saxons sous le terme générique de « catarrhe fébrile ». (Catarrhe saisonnier des auteurs de langue française - SOHIER 1954 b.)

Le fait qu'un syndrome d'allure grippale est la façon de débiter de nombreuses maladies infectieuses augmente encore les difficultés du diagnostic.

2. Grippe à manifestations pulmonaires :

L'atteinte respiratoire est constante dans toute manifestation de la grippe mais revêt une importance très variable. On peut distinguer :

Les manifestations dues au virus lui-même : allant du catarrhe bronchique le plus discret aux gripes pulmonaires fulminantes avec syndrome malin.

La radiologie montre des images très variées : opacités hilaires ou hilifuges, opacités arrondies, nuageuses à limites floues, bandes linéaires scissurales... ; souvent difficiles à superposer aux signes stéthacoustiques.

En fait, la grippe réalise souvent le syndrome de pneumopathie virale : or, ce syndrome, que BOUCHER appelle « bronchite anormale », peut relever de multiples étiologies (EYQUEM : 1953 - CATEIGNE : 1950 - BOUCHER : 1951 - STUART-HARRIS : 1953 - MULDER : 1953 - SCHER : 1952 - SOHIER : 1954 a - 1954 b) :

Agents dûment identifiés : virus de l'ornithose-psittacose, virus grippaux, virus de la chorio-méningite lymphocytaire - Rickettsiose due à R. BURNETTI (Fièvre Q) ; ou seulement *suspectés* : syndrome de pneumonie atypique dite « primitive », caractérisée par la présence dans le sérum d'agglutinines à froid (P.A.P.).

Les manifestations pulmonaires de surinfection ou d'association : par des germes figurés, actuellement évitées par les antibiotiques, mais qui ont conditionné la mortalité de certaines épidémies, relèvent habituellement du Streptocoque, du bacille de Pfeiffer ou du Pneumocoque.

Cette influence favorisante du virus grippal sur les infections associées est souvent évoquée. BORDET et coll. (1953 a-b) ont montré, par infection massive du cobaye, qu'elle relève de l'action toxique du virus et se manifeste surtout pour le streptocoque hémolytique et plus encore pour le bacille de Pfeiffer.

Si le caractère anergisant de la grippe, confirmé par l'absence fréquente de réactions à la vaccination jennerienne chez les grip-

pés, a pu être discuté en ce qui concerne son rôle favorisant dans l'évolution de la tuberculose, il n'est pas rare de voir des tubercules apparaître au décours de grippe ayant entraîné une asthénie consécutive sévère. Quelle que soit la surinfection en cause, le diagnostic peut être ardu si l'épisode initial a passé inaperçu.

3. Autres formes cliniques :

La prédominance de certains symptômes, des localisations atypiques de l'infection, peuvent rendre le diagnostic particulièrement malaisé.

C'est ainsi que les phénomènes de *défaillance cardiaque*, communs dans les formes malignes de la grippe, peuvent quelquefois dominer le tableau clinique et réaliser de véritables formes cardiaques, par atteinte du système neuro-végétatif cardio-vasculaire.

En outre, on peut voir, particulièrement chez l'enfant (MARQUEZY et coll. 1953 - RAYBAUD et coll. 1953), des *manifestations encéphalo-méningées* de la grippe, qui posent alors le problème diagnostique des méningo-encéphalites à liquide clair. Enfin, certaines formes de *laryngites grippales* de l'enfant (LE DEN, 1952), par les signes neuro-toxiques et la sténose laryngée qu'elles entraînent, en imposent souvent pour l'étiologie diphtérique.

Cette revue rapide des manifestations cliniques provoquées par le virus grippal montre combien il est illusoire de compter sur une scène clinique évocatrice pour établir un diagnostic de grippe, puisque un même tableau peut correspondre à plusieurs étiologies et qu'inversement, pour une même étiologie, l'allure clinique peut être extrêmement variable.

B. — FORMES INAPPARENTES DE LA GRIPPE.

Bien plus, on a pu montrer, dès que l'on a été en possession de méthodes permettant de titrer les anticorps contre le virus de la grippe, qu'un grand nombre de sujets présentaient dans leur sérum la preuve de l'infection sans que celle-ci se soit manifestée par une traduction clinique. Cette notion d'infection inapparente, établie par NICOLLE, a été appliquée aux infections à virus et s'est révélée comme un phénomène très général. Pour la grippe, une abondante littérature témoigne de leur réalité (STUART-HARRIS et coll. 1954 - WOLF, 1954 - PONTECORVO, 1953 - CATEIGNE, 1950). Ces formes inapparentes, loin de constituer une rareté, représenteraient un pourcentage important mais variable avec les épidémies : HOYLE (1944), utilisant la réaction de fixation du complément pour la mise en évidence des anticorps, conclut qu'au moins 25 % de la population a été infectée lors de l'épidémie de 1943, alors que moins de 10 % avaient présenté des signes cliniques. La Commission des Affections aiguës des Voies Respiratoires (1948) a montré que, lors de l'épidémie qui affecta l'armée américaine en 1943,

seulement 21 % des sujets reconnus infectés par les investigations sérologiques avaient présenté des manifestations cliniques.

Ainsi, la grippe ne saurait être considérée comme une entité clinique définie.

LA GRIPPE, ENTITE EPIDEMIOLOGIQUE ?

A. — VARIABILITE DES MANIFESTATIONS EPIDEMIOLOGIQUES.

Le caractère erratique de la grippe dans le temps et dans l'espace a de tout temps frappé les observateurs : Le virus, très labile, donne lieu à des manifestations épidémiologiques inconstantes (ANDREWS, 1953) :

De 1850 à 1889, on a enregistré peu de décès en Europe occidentale et il faut attendre la grande *pandémie* de 1889-90, puis celle de 1918-19 pour que les médecins puissent donner une description détaillée de cette forme épidémiologique de la grippe. Très meurtrière par ses complications pulmonaires, celle de 1918-19 frappa surtout les jeunes adultes et causa la mort de 15 à 20 millions de personnes, plus que la guerre elle-même. On admet que lors de cette pandémie, un hybride particulièrement virulent a pris naissance au sein de populations de virus apportés par les troupes venues de diverses parties du monde et réunies en Europe par la guerre. En effet, BURNET et LIND (1951), BURNET et coll. (1953), ont montré expérimentalement que les propriétés de deux virus grippaux pouvaient s'échanger de façon à donner naissance à un mutant stable possédant des caractères antigéniques mixtes. En dix ans après, la grippe avait repris une forme relativement bénigne :

On a pu se demander si cette pandémie était bien due au virus grippal lui-même, tant ses manifestations épidémiologiques et ses particu-

La forme épidémique habituelle en a été décrite maintes fois en trente ans dans le monde entier : caractérisée par un brusque clocher de morbidité au sein d'une population, mais localisée à un pays, voire une région, une ville ou même une collectivité, elle s'éteint spontanément en quelques semaines, donnant lieu à un nombre restreint de complications pulmonaires et de décès qui surviennent surtout chez les sujets âgés ou débilisés.

Depuis 1933, les manifestations aiguës semblent s'espacer. En tout cas, on n'a pas, à cette époque, isolé le virus en cause et l'on revanche, les enquêtes sérologiques systématiques, outre les formes inapparentes en période épidémique, ont permis de rattacher à la sein d'une collectivité apparemment indemne, cas sporadiques, ca-grippe des cas isolés affectant quelques individus, voire un seul au ractérisant la forme *endémo-épidémique* de la grippe.

Depuis une vingtaine d'années, on a isolé les virus de chaque épidémie et on les a classés en trois groupes connus A, B, C. On a vu que les types A et B étaient distincts épidémiologiquement : Aux Etats-Unis, on admet (ANDREWES, 1953) que dans une même collectivité, les épidémies de grippe à virus A reviennent tous les 2 ou 3 ans, celles à virus B tous les 6 ans, le virus C ayant un rôle encore peu étudié.

Tel est le caractère extrêmement mouvant des manifestations épidémiologiques de la grippe. Pour l'expliquer, les chercheurs, avec l'aide des techniques modernes de laboratoire, ont essayé d'élucider les facteurs qui le conditionnent.

B. — FACTEURS INVOQUES.

En effet, d'après GORDON (1950), l'épidémiologie ne se limite pas à « l'étude des infections dans leurs rapports avec les collectivités » (ZOELLER), mais s'étend à tout fait dans le déterminisme duquel intervient un agent causal, biologique, physique, chimique, un hôte, un milieu. Appliquée à la grippe, cette définition a permis d'apporter quelque lumière sur les facteurs qui conditionnent l'éclosion des épidémies :

Facteurs physiques :

L'évolution saisonnière de cette infection n'a pas reçu, à ce jour, d'interprétation satisfaisante ; tout au plus, les récentes hypothèses ou études sur le rôle de l'humidité (WADBY, 1952) dans le déterminisme de la déshydratation des muqueuses rhino-pharyngées ont permis d'entrevoir le mécanisme possible de l'éclosion des épidémies, sans donner toute la solution du problème de leur périodicité.

Facteurs biologiques tenant à l'hôte :

On tend à admettre actuellement que les saisons interviendraient plus sur le sujet récepteur que sur l'agent pathogène (LEBRUN et coll. 1954).

La pénétration ou la multiplication du virus dans les voies respiratoires pourraient être empêchées par des facteurs non spécifiques présents dans les exsudats des voies respiratoires, facteurs en quelque sorte protecteurs, que des micro-organismes figurés pourraient altérer, favorisant ainsi l'infection. De même, les perturbations provoquées par une vaccination dans les processus de défense de l'organisme ont pu être invoquées comme facteur de fixation de l'infection virale : le fait rapporté par R. SOHIER (1954 a) pour la mononucléose infectieuse a été retrouvé chez l'un de nos malades pour la grippe (voir p. 65).

Un rôle très important dans l'éclosion des épidémies paraît devoir être attribué à l'état d'immunité des sujets soumis à l'infection. L'immunité acquise par une collectivité à l'occasion d'une première atteinte conditionnerait la protection relative lors d'une épidémie ultérieure. Ce facteur expliquerait en partie l'extinction spontanée des épidémies ainsi que leur périodicité; en effet, les travaux récents très significatifs fournis par HILLEMANN et coll. (1953), révèlent que la population longtemps exposée à l'infection par un virus présente des titres d'anticorps élevés et que, lorsque cesse l'endémo-épidémie, les enfants nés après cette date n'ont pas d'anticorps.

Un problème intéressant est posé également par la conservation du virus en dehors des épidémies. On a soulevé l'hypothèse d'infections latentes ou dormantes (KOPROWSKI, 1952) de sujets apparemment sains et dont le virus se « réveillerait » sous l'influence de facteurs extrinsèques (ANDREWES, 1953). Cette notion a pu être suggérée par certaines particularités de propagation des épidémies; par exemple, HOYGAARD (1939), a constaté qu'un délai de deux à plusieurs mois a pu s'écouler entre le moment où des bateaux contaminés accostèrent au Groenland et celui où une épidémie y éclata. L'idée supporte enfin quelque vraisemblance sans avoir toutefois reçu de confirmation, si l'on se réfère aux importants travaux de SHORE (1949): ce dernier a montré que le virus de la grippe du porc pouvait survivre pendant des mois et des années dans les vers parasites du poumon du porc, lesquels comportent un cycle évolutif dans la terre; on ne peut décèler ces virus à partir de ces vers que si l'on inocule le porc par voie orale et si l'on fait intervenir des artifices tels que l'injection de divers produits favorisant la réceptivité. Rien ne s'oppose à priori à ce que des faits voisins sinon identiques soient observés chez l'homme.

Facteurs biologiques tenant au virus :

Un autre facteur important de la variabilité des manifestations de la grippe réside dans la multiplicité des souches de virus. Les recherches immunologiques modernes ont, en effet, montré qu'il existe trois types antigéniques distincts, A, B, C (ANDREWES, 1953). Pour chaque type existent en outre des prototypes qui, pour les virus A, sont désignés par les notations WS, PR8 et FM1 (ex A prime) et pour les virus B par les notations LEE et BON. Mais il y a en outre, pour les virus A, un prototype un peu différent de FM1, le FW1 50. Bien plus (ISAACS et coll. 1952), parmi les virus A, on a distingué récemment deux sous-groupes: L (LIVERPOOL) et S (SCANDINAVIAN), en appréciant l'avidité ou pouvoir de combinaison des virus et des anticorps au cours des phénomènes d'inhibition de l'hémagglutination. Cette propriété a d'ailleurs permis (VAN DER VEEN, 1950) de caractériser trois phases possibles pour un virus, phases dites P,

Q et R; or, les souches L étaient toutes en phase P tandis que les phases L étaient en phases Q. En ce qui concerne les virus B, on aurait récemment isolé des souches qui différeraient des deux prototypes LEE et BON (TAMM et coll. 1950 - HILLEMANN et coll. 1950).

Si pendant plusieurs années on a isolé un seul type antigéniquement bien défini au cours d'une épidémie et si ce même type a pu être retrouvé dans tous les pays atteints par la grippe à une même période - type WS ou PR8 (VON MAGNUS, 1953), à partir de 1946 sont apparues des souches nettement différentes comme celles appelées d'abord A' puis FM1. Ainsi apparaissent des groupes et sous-groupes nouveaux et l'on est en droit de se demander si les virus grippaux ne sont pas en constantes mutations (ANDREWES, 1950), capables de faire naître des types antigéniques nouveaux, et ce peut-être du fait de leur passage sur l'homme comme tendraient à le prouver les variations antigéniques obtenues par culture d'un virus grippal sur œuf embryonné en présence de sérum hétérologue (ARCHETTI, 1950 et 1952). Ces données éclairent d'un jour nouveau les modalités de diffusion de la grippe mais compliquent aussi singulièrement le problème de la vaccination, puisque un vaccin ne contenant pas le type en cause dans une épidémie ne saurait protéger contre la maladie (FRANCIS et coll. 1947).

Ainsi la grippe ne saurait être considérée comme une entité épidémiologique suffisamment univoque pour qu'on puisse baser un diagnostic sur ses modalités de propagation.

C. — THEORIES.

Pour expliquer celles-ci, deux théories s'affrontent actuellement :

1. - *La théorie du virus latent*, qui prévaut surtout aux Etats-Unis, s'appuie sur la disparition du virus en période inter-épidémique, sur l'éclosion simultanée des épidémies en différents points du globe très éloignés, sur les épidémies d'été préluant aux épidémies d'automne, et surtout sur la découverte du virus de SNOPE.

2. - La seconde théorie concerne la *persistance et la propagation ininterrompue* de la grippe humaine. Elle avance que le virus se conserve par une transmission continue d'un sujet à l'autre. Cette supposition implique qu'il y a toujours une apparition de grippe quelque part dans le monde, le virus passant d'une région à l'autre sur les individus sensibles puis revenant à son point de départ pour déclencher une nouvelle épidémie lorsque l'immunité engendrée par la première atteinte a disparu. L'alternance des saisons d'une hémisphère à l'autre pourrait justifier cette hypothèse. Le fait que l'immunité acquise par une population est spécifique

de la souche précédemment rencontrée alors que les caractères antigéniques des virus sont en perpétuel remaniement, expliquerait que la propagation de proche en proche ne soit pas toujours évidente.

Tous ces problèmes n'ont pu être partiellement résolus que par la mise en œuvre de toutes les méthodes que les laboratoires modernes mettent actuellement au service des chercheurs et dont l'Organisation Mondiale de la Santé groupe les résultats pour une synthèse à l'échelle du globe.

Quelles sont ces méthodes et quel est leur rôle dans ces recherches ?

CHAPITRE II

MÉTHODES DIRECTES DE DIAGNOSTIC SPÉCIFIQUE ISOLEMENT DU VIRUS

La méthode de diagnostic de la grippe par isolement du virus possède la même valeur absolue que l'isolement du germe dans les infections bactériennes. Mais, alors que dans ces dernières cet isolement est nécessaire pour pouvoir affirmer le rôle du germe dans le déterminisme de l'infection, on ne saurait exiger ce critère dans les infections à virus : les techniques virologiques sont en effet plus délicates à mettre en œuvre que les techniques bactériologiques, le virus est présent dans les produits pathologiques prélevés chez le malade pendant un temps trop court pour que l'échec de l'isolement signifie nécessairement que le virus incriminé n'était pas en cause.

Malgré ces difficultés, la méthode présente un intérêt capital, surtout au début des épidémies en fournissant au laboratoire des souches dont le type antigénique pourra être identifié et qui pourront servir d'une part à préparer des antigènes pour le diagnostic sérologique d'autres malades, d'autre part à fabriquer éventuellement un vaccin.

PRELEVEMENT DES PRODUITS PATHOLOGIQUES

A. — TECHNIQUES PROPOSEES.

Quelle que soit la méthode d'inoculation choisie, animal ou œuf incubé, il faut effectuer ce prélèvement à l'endroit et au moment où le virus a le plus de chances d'être présent : c'est dire que dans la plupart des cas on pratiquera un lavage de nez ou de gorge. Dans quelques cas de méningo-encéphalite grippale, le liquide céphalo-rachidien pourra être utilisé ; enfin, en cas de décès

du malade par grippe à forme pulmonaire, l'inoculation pourra être tentée avec un fragment de poumon convenablement broyé et mis en suspension dans une solution physiologique. Il ne faut cependant pas attendre de grands résultats de cette dernière méthode à cause du stade tardif du prélèvement où le virus a généralement disparu des voies respiratoires.

La plupart des auteurs sont d'accord pour exiger de ces prélèvements qu'ils soient pratiqués dans des conditions assez rigoureuses :

LEPINE et SOHIER (1954), recommandent la technique suivante : Le malade se gargarise avec de l'eau ou du soluté physiologique ou du lait écrémé (15 ml.) ; dans le cas de l'eau ou du soluté, on ajoutera 5 ml. de bouillon bactériologique immédiatement après le gargarisme et le tout sera placé le plus rapidement au froid ; le prélèvement doit être effectué en tout état de cause avant le 5^e jour après le début de la maladie. Le matériel ne sera envoyé à un laboratoire que si l'on est en mesure de le placer dans un récipient garni de glace ordinaire ou de glace carbonique en quantité suffisante pour la durée du voyage ; sinon il sera envoyé par la poste ordinaire sans être réfrigéré mais après adjonction d'un volume égal de glycérine neutre.

STUART-HARRIS (1953) proposait une technique sensiblement identique si ce n'est qu'il fixait à deux jours le délai maximum du prélèvement.

WOLFF (1954) a mené une étude critique des conditions techniques de prélèvement et de conservation du gargarisme permettant la survie maxima du virus et a fait varier systématiquement tous les facteurs (WOLFF cherchait à utiliser ce liquide de prélèvement comme antigène).

Délai de prélèvement : Sur 43 lavages de gorge effectués chez des grippés confirmés et inoculés sur œuf de poule incubé :

— 24 prélevés dans les 24 heures qui suivirent l'établissement des symptômes donnèrent 22 succès ;

— 17 prélevés après 24 à 48 heures donnèrent seulement 6 succès.

— En outre furent isolées 2 souches pour lesquelles ces délais étaient inconnus.

Traitement avant inoculation : Pour étudier expérimentalement les conditions de conservation du virus, WOLFF mesure, par inoculation en série à la souris, le pourcentage de doses infectieuses 50 restant, après mise en suspension dans des solutions et sous des conditions variées, dans des liquides allantoïques infectés dont le titre initial était de 100 doses infectieuses 50.

LIQUIDE	CONSERVATION	% I.D. 50 RESTANT
eau salée 0,9 %	24 h. à 37°	25
id.	24 h. à 18°	60
bouillon salé	24 h. à 37°	75
id. + salive	emploi immédiat	40
	24 h. à 4°	0
id. + id. + antibiot.	emploi immédiat	40
	24 h. à 37°	40
	24 h. à 18°	40
	24 h. à 4°	40
eau salée + salive + antibiot.	24 h. à 4°	— de 10

Interprétation : 1. - La conservation en eau salée altère le virus 2 fois plus à 37° qu'à 18° ;

2. - Elle l'altère 3 fois plus qu'en bouillon ;

3. - La salive détruit tout virus en 24 heures, même en bouillon ;

4. - Les antibiotiques (400 U/ml. de pénicilline ; 1/4 de mg./ml. de streptomycine) :

— Empêchent la partie de cette action due aux bactéries,

— N'empêchent pas l'action propre de la salive (40 au lieu de 75) ;

5. - En présence de bouillon et d'antibiotiques, les conditions de température n'ont pas d'influence ;

6. - L'eau salée additionnée de salive est impropre à conserver le virus même en présence d'antibiotiques.

WOLFF tire de cette étude les conditions optima suivantes :

— Le lavage direct avec du bouillon ayant l'inconvénient de son mauvais goût et de la mousse abondante produite par le gargarisme, celui-ci est pratiqué avec eau salée contenant des antibiotiques et rejetée immédiatement dans un récipient contenant du bouillon.

B. — TECHNIQUE PERSONNELLE : ANALYSE DE 15 TENTATIVES D'ISOLEMENT.

i. Conditions de prélèvement et traitement du gargarisme :

En 1953 et 1955, tous les gargarismes furent pratiqués par injection intranasale, à la seringue, de 10 à 20 ml. de sérum physiologique salé rejetés dans un flacon contenant environ 1.000 U de pénicilline.

Mais, en 1953, il avait paru utile de recommander au malade de cracher dans le flacon à la fin de son gargarisme : on espérait par cette pratique obtenir une détersion plus complète de la muqueuse.

Le prélèvement était alors rapidement apporté au laboratoire de la Faculté où, dans un premier temps, il était conservé au frigorifique à $+4^{\circ}$ en attendant d'être congelé à -20° .

Enfin, il était décongelé pour inoculation à la cavité amniotique l'œuf incubé. Voici quels furent, pour 15 prélèvements, les délais de prélèvement par rapport au début des signes cliniques et les conditions de conservation avant inoculation :

NOM	DÉLAI PRÉLÈV.	DURÉE à 4°	CONSERV. à -20°	DÉLAI INOC.	SALIVE	RÉSULTAT
PEN.,	1 ^{er} jour	1 ^{er} jour	1 ^{er} jour	1 jour	+	+
OVI.,	1 ^{er} jour	20 —	68 —	89 —	+	0
RAB.,	2 ^e —	1 ^{er} —	2 —	3 —	0	+
ASS.,	2 ^e —	1 ^{er} —	4 —	5 —	+	±
BAR.,	2 ^e —	1 ^{er} —	4 —	5 —	+	±
LAV.,	2 ^e —	1 ^{er} —	23 —	25 —	0	+
DE P.,	2 ^e —	1 ^{er} —	25 —	26 —	0	+
BRE.,	2 ^e —	1 ^{er} —	98 —	99 —	+	0
VIL.,	2 ^e —	1 ^{er} —	30 —	32 —	+	0
PES.,	3 ^e —	1 ^{er} —	66 —	69 —	+	0
PAN.,	3 ^e —	1 ^{er} —	66 —	69 —	+	0
DUP.,	4 ^e —	1 ^{er} —	24 —	28 —	0	0
PET.,	5 ^e —	24 —	7 —	36 —	+	0
TAR.,	5 ^e —	24 —	20 —	49 —	+	0
ESC.,	5 ^e —	24 —	20 —	49 —	+	0

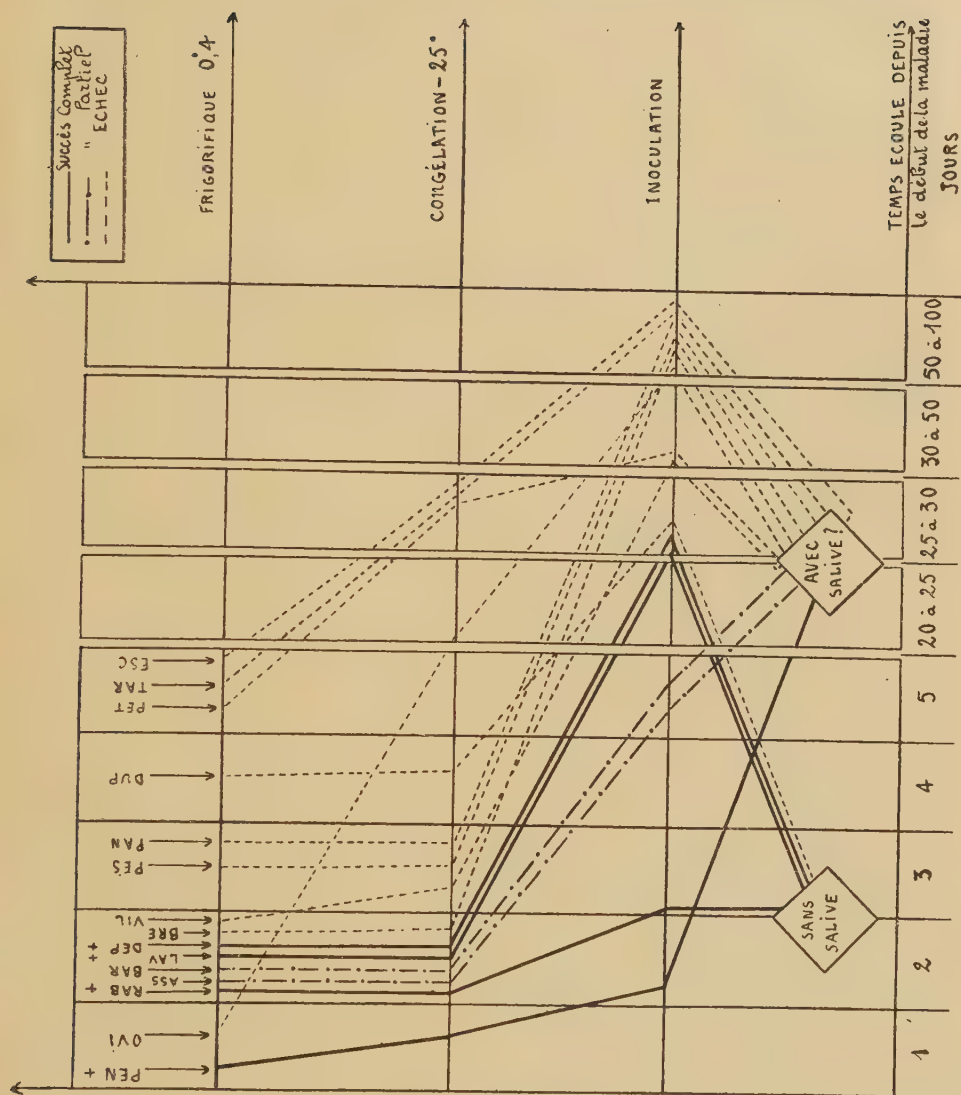
Ces données sont matérialisées dans le graphique I. Outre ces 15 tentatives à partir de gargarismes, furent mises en œuvre une inoculation à partir de liquide céphalo-rachidien et une à partir d'un fragment de poumon prélevé *post-mortem* ; elles échouèrent.

2. Interprétation :

a) *Influence du délai de prélèvement par rapport au début de la maladie :*

- Tous les prélèvements effectués après 48 heures ont donné lieu à un échec ;
- Sur 7 pratiqués au 2^e jour, on enregistre 3 succès, 2 débuts de succès, 2 échecs.

Les 2 débuts de succès ont consisté dans une faible hémagglutination des liquides allantoïques ou amniotiques au premier passage pour l'un, aux 3 premiers pour l'autre ; mais finalement, ces tentatives d'isolement échouèrent.



Graphique I.

On peut donc dire d'après ces résultats que le prélèvement doit être effectué dans les 48 heures qui suivent l'installation des symptômes.

b) Influence des conditions de conservation avant inoculation.

Conservation à 4° avant la congélation :

Chez 9 sujets dont le lavage avait été pratiqué dans les 48 heures :

- 7 conservés à 4° moins de 24 heures ont donné : 6 succès (4 complets), 1 échec ;
- 2 conservés à 4° plus de 24 heures ont donné : 2 échecs.

Donc : il faut congeler le matériel le plus rapidement possible après le prélèvement.

Durée de la congélation :

Des 7 lavages prélevés dans les 48 heures et conservés à 4° moins de 24 heures :

- 2 gardés congelés avant inoculation pendant 24 heures ont donné 2 succès ;
- 2 gardés congelés avant inoculation pendant 4 jours ont donné 2 débuts de succès ;
- 2 gardés congelés avant inoculation pendant 23 et 25 jours ont donné 2 succès.
- 1 gardé congelé avant inoculation pendant 98 jours a donné 1 échec.

Donc : A condition d'un prélèvement précoce et d'une congélation rapide, une congélation prolongée (jusqu'à 25 jours dans nos exemples) est compatible avec la survie du virus dans le liquide de lavage : cette latitude est appréciable en période d'épidémie où le grand nombre de prélèvements effectués peut être stocké au congélateur, ce qui permet des inoculations échelonnées dans le temps, sans embouteiller le laboratoire ni exiger un nombre exagéré d'œufs dans un court laps de temps.

c) Influence de la présence de salive dans le prélèvement :

Des 7 lavages répondant aux conditions initiales d'un prélèvement précoce et d'une congélation non différée :

- 3 prélevés en 1955, sans addition de salive ont donné 3 succès complets ;
- 4 prélevés en 1953 avec addition de salive ont donné :
 - 1 seul succès complet,
 - 2 succès partiels,
 - 1 échec.

Il semble, en particulier, qu'on puisse attribuer à la présence de salive dans le liquide de lavage, la faible concentration du virus aux premiers passages et sa disparition aux suivants, dans les cas de ASS. et BAR. ; l'échec complet dans le cas de BRE. pouvant relever en partie de ce facteur, en partie d'une congélation trop longtemps maintenue (98 jours).

Conclusion :

De l'analyse des conditions de prélèvement dans nos 15 tentatives d'isolement se dégagent les points suivants :

1. - Nécessité impérative d'un prélèvement effectué dans les 48 heures au plus tard qui suivent l'installation des symptômes ;
2. - Nécessité de congeler le liquide dans les 24 heures qui suivent le prélèvement ;
3. - Sous ces conditions, grande latitude du délai d'inoculation (25 jours minimum dans nos cas) ;
4. - L'étude de WOLFF suggère enfin :
 - l'intérêt de l'addition au liquide de lavage d'antibiotiques,
 - la supériorité du bouillon salé comme liquide de lavage qui, si nous l'avions employé, nous aurait probablement permis d'isoler davantage de souches,
 - l'action néfaste de la salive sur le virus, confirmée par l'unique succès enregistré en 1953, s'opposant aux 3 succès obtenus en 1955.

INOCULATION (1)

1. — INOCULATION AU FURET.

On emploie des furets « Putorius (Mustela) furo », animal de choix pour l'inoculation du virus grippal (SMITH et coll. 1933).

Par instillation intra-nasale, le liquide de lavage de gorge détermine chez le furet, en 48 heures, une élévation franche de température avec écoulement nasal et anorexie. Elle s'abaisse à la normale au deuxième jour pour remonter le troisième jour. Au cours de ces trois jours, l'écoulement se précise et peut devenir purulent. Dès que la température est revenue à la normale, l'animal reprend sa vitalité et guérit.

Si le furet est inoculé sous anesthésie (éther), il ne développe pas de lésions pulmonaires, à moins que le virus ait été modifié par passages successifs sur plusieurs furets : un tel virus adapté provoque souvent la fièvre en 24 à 48 heures et, à mesure qu'elle progresse, la respiration devient difficile, l'animal présente un toux sèche, caractéristique de la réaction trachéo-bronchique. Si on

(1) D'après LÉPINE et SOHIER, 1954 ; voir aussi STUART-HARRIS, 1953.

laisse évoluer l'infection, la guérison survient habituellement du dixième au quinzième jour. Il est préférable de sacrifier l'animal à l'apogée des symptômes vers le cinquième jour : on incise les fosses nasales et on extrait les cornets ainsi que la muqueuse rhinopharyngée ; les poumons prélevés montrent des zones brunâtres localisées prédominant aux hiles mais souvent aussi s'étendant à un segment pulmonaire, voire à tout un lobe. Il faut noter (STUART-HARRIS, 1953) que le virus est dans tous les cas présent dans les poumons bien qu'à un degré moindre que dans la muqueuse nasale, surtout si l'animal a été inoculé sous anesthésie, à l'éther, même s'il n'y a pas de lésions pulmonaires macroscopiques visibles.

Au contraire du virus A, le virus B peut ne pas déterminer, chez le furet, de manifestations cliniques, mais dans tous les cas, le sérum développe des anticorps spécifiques prouvant l'infection.

Le broyat des organes prélevés peut servir à inoculer d'autres animaux (furets, souris) ou, après addition d'antibiotiques, à inoculer des œufs par voie amniotique. Deux échantillons de sérum prélevés chez l'animal au début et au décours de la maladie peuvent permettre, de plus, la mise en évidence d'une apparition d'anticorps spécifiques.

2. — INOCULATION A LA SOURIS.

La souris, impropre à l'isolement direct du virus, peut cependant être infectée avec du matériel provenant du furet ou de l'œuf infectés : habituellement, plusieurs passages sont nécessaires sur la souris par voie intra-nasale et sous anesthésie, avant qu'en apparaissent ces lésions pulmonaires. Elles sont semblables à celles du furet mais sont plus étendues ; de plus, des souches passées en séries sur la souris deviennent très virulentes et la tuent régulièrement en 4 à 10 jours même à la dilution du 1/1.000^e ou plus ; la densification pulmonaire est massive.

3. — INOCULATION AU HAMSTER.

Le hamster doré est directement inoculable par la même technique que le furet mais il est beaucoup moins sensible au virus grippal et ne réagit souvent que par une élévation du titre de ses anticorps.

4. — INOCULATION A L'ŒUF INCUBE (1).

Le virus de la grippe est aujourd'hui plus aisément cultivé à partir des sécrétions humaines par injection dans l'œuf de poule incubé : La cavité amniotique (BURNET, 1940) entourant l'embryon

(1) On consultera avec profit pour le détail de ces techniques : LÉPINE P. et SOHIER R. : « Méthodes de laboratoire appliquées au diagnostic des maladies à virus » (1954), ainsi que l'ouvrage de BEVERIDGE et BURNET (1946), qui comporte un exposé détaillé des techniques et une importante bibliographie.

contient normalement une faible quantité de liquide et, comme le bec de l'embryon baigne dans le liquide, il est évident que le matériel injecté peut ainsi pénétrer dans les voies respiratoires de l'embryon. La sensibilité de l'embryon est maxima vers le treizième jour du développement, au moment où le poumon commence à constituer son épithélium bronchiolaire primitif. L'inoculation amniotique s'impose pour l'isolement du virus à partir des liquides humains. En principe, elle se pratique sur des œufs ayant subi une pré-incubation de 12 à 13 jours pour le virus A, et de 8 à 10 jours pour le virus B. En pratique, on se place dans des conditions moyennes en employant des œufs de onze jours. Le matériel à inoculer est additionné d'antibiotiques (pénicilline, 1.000 unités ; streptomycine, 200 Mus par ml.) et injecté à raison de 0,2 ml. par œuf. Les conditions techniques d'inoculation, de prélèvement des liquides infectés, d'adaptation du virus aux différentes annexes de l'œuf ont fait l'objet de très nombreux travaux. Au Laboratoire d'Hygiène, une étude critique des différentes méthodes d'inoculation menée par ESSER et SOHIER (1952) a fait adopter la technique suivante pour l'inoculation par voie amniotique :

L'œuf étant placé à la verticale sur un mireur, après repérage soigneux de l'embryon à travers la coquille, une aiguille à extrémité fine montée sur une seringue contenant le liquide à inoculer est enfoncée d'un coup sec dans la direction de l'embryon. Au moment où elle pénètre dans le sac, l'embryon effectue un mouvement de recul ; on retire alors légèrement l'aiguille et on injecte. Le risque d'injection de l'inoculat dans la cavité extra-embryonnaire présenté par cette méthode est minime et largement compensé par les avantages qu'elle présente sur les méthodes à vision directe qui, comportant l'ouverture de la coquille, entraînent une mortalité non spécifique considérable.

Les œufs sont ensuite placés à incuber à 35° C et examinés quotidiennement. Les œufs qui meurent dans les 24 premières heures sont rejetés ; les œufs vivants sont ouverts au bout de 48 heures : après refroidissement des œufs à 4° C afin de réduire l'hémorragie, les liquides amniotiques et allantoïques sont prélevés stérilement par aspiration à la pipette à boule, et soumis à un contrôle de stérilité bactérienne. L'infection de l'œuf est reconnue à l'aspect de l'embryon mais en pratique, elle est plus élégamment mise en évidence par le développement dans le liquide d'hémagglutinines : chaque liquide est soumis à une épreuve d'hémagglutination dite « de dégrossissage » effectuée sur plaque spéciale ; suivant la méthode centripète d'HIMMELWEIT (1949) : Une goutte du liquide recueillie de chaque échantillon sur une lame est additionnée d'un peu de sang de l'embryon dilué en eau physiologique ; on mélange et on observe après 10 minutes une agglutination des hématies rappelant l'aspect d'un mélange de sérum et de globules incompati-

bles ; cette hémagglutination, rare au premier passage, apparaît le plus souvent après deux ou trois passages aveugles. Après un ou deux passages par voie amniotique, le virus se développe également dans la membrane du sac allantoïque entourant l'embryon. Dès que les liquides amniotiques montrent la présence d'hémagglutinines, le virus peut être adapté au liquide allantoïque ; cette cavité est beaucoup plus aisée à inoculer et fournit des quantités relativement importantes d'un liquide acellulaire et qui contient un titre élevé en virus. A titre d'exemple, voici quelles ont été les conditions d'apparition du pouvoir hémagglutinant dans le liquide amniotique et les délais d'adaptation à l'allantoïde pour nos 6 tentatives d'isolement ayant donné lieu à infection des œufs :

En fait, la seule preuve indiscutable est la reproduction expérimentale de la maladie par inoculation au furet. Cette méthode, peu pratique, est actuellement remplacée par des méthodes sérologiques moins directes mais tout aussi probantes : en pratique, on peut faire appel à deux méthodes :

— On peut préparer, à partir des liquides infectés, des antigènes pour la réaction de fixation du complément qu'on introduit dans une réaction avec des sérums connus pour être positifs.

On préfère préparer, à partir de ces liquides, une hémagglutinine qu'on introduit dans une réaction d'inhibition de l'hémagglutination par des sérums standards connus.

IDENTIFICATION DES SOUCHES

La réaction d'inhibition de l'hémagglutination est, en effet, la seule méthode qui permette de déterminer la variété du virus isolé. L'inhibition étant étroitement spécifique de la souche utili-

Inoculation par voie amniotique : 2 souches ont développé des agglutinines après inoculation initiale ; les 4 autres ont exigé un passage aveugle.

Inoculation par voie allantoïque : 2 souches étaient adaptées après un seul passage, 1 après 2 passages, 2 après 3 passages ; 1 souche n'a pu être adaptée à l'allantoïde malgré 3 tentatives.

PREUVES DE LA PRESENCE DU VIRUS

L'apparition d'un pouvoir hémagglutinant dans les liquides, décelé par la méthode rapide sur plaque, ou titré par une méthode en tubes, ne constitue pas une preuve formelle que le virus grippal est bien en cause, de nombreux facteurs pouvant provoquer une hémagglutination non spécifique. FAUCONNIER (1953) a proposé une détermination pratique, basée sur l'étude du pH, de l'infection des liquides : Le pH des œufs inoculés est supérieur à 7, celui des témoins inférieur à 7 et sa mesure permettrait d'éviter le recours à l'hémagglutination.

sée, il faut donc préparer des sérums de référence pour chaque type de virus connu. On peut s'adresser aux sérums d'animaux infectés (furet, hamster, souris) plus spécifiques mais plus délicats à obtenir, ou à ceux d'animaux artificiellement immunisés (cobaye, lapin, coq), un peu moins spécifiques mais de préparation simple.

Par cette dernière méthode, les 4 souches isolées au laboratoire d'Hygiène (une en 1953, trois en 1955) furent identifiées comme des virus du type A' (FM1).

Envoyées au Centre Mondial de la Grippe de Londres, pour détermination du sous-type et l'identification antigénique complète, elles se sont révélées appartenir au type FM1, sous-type *Scandinavica*, antigéniquement semblables à la souche (A/England/1-53).

Il faut noter que l'échec ou l'impossibilité d'isoler la souche responsable d'une épidémie n'empêche pas la détermination du type de virus en cause, à condition de disposer d'un lot d'agglutinines de chaque type dûment titrées ; la mise en œuvre de la réaction d'inhibition avec les sérums des malades de l'épidémie permet alors de constater que ceux-ci ne sont positifs que vis-à-vis d'un seul type d'hémagglutinine, celle qui est antigéniquement semblable au virus responsable.

VALEUR ET INTERET DE LA METHODE D'ISOLEMENT

Le délai pratique nécessaire pour obtenir une réponse est très variable mais en tout cas assez long. En effet, dans les conditions habituelles d'approvisionnement en œufs des laboratoires, on ne dispose pas forcément d'œufs de 11 jours au moment où le prélèvement parvient au laboratoire. Ce délai dépend également du nombre de passages nécessaires pour l'adaptation allantoïque, variable avec le virus.

Dans les conditions les plus favorables (œufs de 11 jours, hémagglutination du liquide amniotique dès l'inoculation, adaptation à l'allantoïde après le premier passage), ce délai ne saurait être inférieur à 5 jours. En pratique, il est souvent très supérieur et atteint couramment 15 jours. On ne saurait donc compter sur cette méthode pour établir un diagnostic de grippe d'autant qu'elle est sujette à de nombreuses défaillances.

Elle présente surtout un intérêt épidémiologique capital en fournissant sur la propagation de la maladie des renseignements que ne peut donner l'examen des sérums humains, en permettant la préparation d'un vaccin spécifique de l'épidémie.

Elle permet enfin aux laboratoires la préparation des antigènes servant au diagnostic sérologique.

CHAPITRE III

MÉTHODES INDIRECTES DE DIAGNOSTIC SPÉCIFIQUE:

MÉTHODES SÉROLOGIQUES :

I. RÉACTION D'INHIBITION DE L'HÉMAGGLUTINATION

On classe sous le nom de méthodes indirectes les réactions ayant pour but de déceler dans le sérum des anticorps spécifiques pour les virus grippaux. On peut actuellement utiliser trois types de méthodes :

— Soit la mise en évidence d'anticorps inhibant spécifiquement l'hémagglutination due aux virus grippaux, plus connue sous le nom de réaction d'inhibition de l'hémagglutination (réaction de HIRST).

— Soit la recherche des anticorps, ou sensibilisatrices, fixant spécifiquement le complément en présence d'un virus grippal ou de produits dérivés.

— Soit la constatation d'un pouvoir neutralisant, spécifique pour un virus grippal, du sérum de sujets ou d'animaux guéris de l'infection.

En pratique, seules les deux premières réactions sont utilisées couramment pour le diagnostic biologique de l'infection grippale. Si la recherche d'un pouvoir neutralisant est d'un intérêt indiscutable pour apprécier les propriétés antigéniques d'un virus et l'infectiosité d'un produit viral, elle est trop délicate, longue et onéreuse, pour constituer une méthode courante de diagnostic.

A. - LE PHENOMENE D'HEMAGGLUTINATION

La constatation fortuite par HIRST (1941) puis par Mc CLELLAND et HARE (1941) de l'auto-hémagglutination des hématies de l'embryon de poulet sous l'influence du virus grippal a permis la mise

au point de méthodes pratiques de caractérisation du virus dans un milieu, d'appréciation de ses modalités de développement, d'identification enfin.

En outre, on a constaté que les sujets infectés par un ultra-virus peuvent élaborer des anticorps qui, présents dans le sérum, ont la propriété d'inhiber spécifiquement l'agglutination des hématies par un virus identique à celui qui est à l'origine de l'infection.

L'étude de l'hémagglutination, en vue de ses applications pratiques, doit donc comporter :

1° La réalisation d'une suspension d'hématies convenablement choisies ;

2° L'obtention de l'hémagglutinine spécifique ;

3° Une méthode de titrage de cette hémagglutinine.

1° - Pour les virus grippaux, les *hématies* qu'il convient d'utiliser de préférence sont celles de poule jeune, de moins d'un an si possible, ou des hématies humaines du groupe « 0 ».

On prélève le sang dans la veine axillaire ou par ponction cardiaque, sur 20 p. 100 en volume de citrate de sodium à 2 p. 100. Le sang citraté peut être conservé à 4° C. pendant une semaine au maximum ; la suspension standard doit renfermer 0,5 % d'hématies, quantité appréciée par rapport au culot après 3 lavages successifs et centrifugation pendant dix minutes à 3.000 tours.

Elle doit être fraîchement préparée avant chaque épreuve.

2° - Les *hémagglutinines* des virus de la grippe sont liées à la fraction virale, contrairement à celles d'autres virus qui sont liées à un composant soluble dissociable du micro-organisme infectieux.

L'hémagglutination qu'elles provoquent est spontanément réversible : Lorsque le virus grippal a été adsorbé sur les hématies dont il a provoqué l'agglutination, il peut spontanément se rendre libre à nouveau, sans qu'on ait modifié les conditions physico-chimiques du milieu. Le virus ainsi élué garde toutes ses propriétés, dont l'aptitude à agglutiner des hématies neuves. Mais les hématies sur lesquelles le virus s'était fixé sont définitivement altérées. Tout se passe comme si les hématies avaient à leur surface des récepteurs que détruit le virus par un phénomène très vraisemblablement enzymatique et, en outre, comme si chaque virus avait sur les hématies des récepteurs propres (BURNET et coll. 1946 a - BURNET, 1951).

A l'heure actuelle, il est recommandé de *préparer ces agglutinines* à partir de liquides allantoïques infectés par les souches PR8 et FM1 pour le virus A et les souches LEE ou BON pour le virus B.

Il faut savoir que la quantité de virus inoculé intervient pour provoquer ou non la formation d'hémagglutinine qui est nulle pour une trop forte concentration en virus (HENLE et coll. 1943 - VIEU-

CHANGE et coll. 1947 - VON MAGNUS, 1947 - ESSER, 1952) et optima pour un titre infectieux et un délai définis.

La concentration des hémagglutinines peut être obtenue par trois types de procédés :

— Les procédés physiques consistent dans la centrifugation à vitesse telle que l'hémagglutinine sédimente avec le virus auquel elle est liée. On remet le culot en suspension dans un liquide convenable (WEIL, 1948).

La concentration chimique est obtenue par précipitation des protéines du virus, sans les dénaturer, par l'alcool méthylique (Cox et coll. 1947).

— La concentration par adsorption et élution peut être avantageusement utilisée ; une technique a été mise au point pour le virus grippal par FRANCIS et coll. (1948).

Les hémagglutinines grippales se conservent relativement bien. On note d'ailleurs une résistance variable suivant les souches, à la chaleur et au formol. En pratique on les conserve au réfrigérateur à 4° après dilution des liquides allantoïques au 1/4 et addition de merthiolate (concentration finale 1/10.000) comme préservatif. Ils constituent ce qu'on appelle « l'antigène-stock ».

3° Techniques de titrage de l'hémagglutinine.

Elles s'inspirent de celle de HIRST (1942) modifiée par SALK (1944). Le principe en est très simple : des dilutions croissantes de virus sont mises en contact avec une suspension d'hématies sensibles dans des tubes à fond sphérique. La lecture est faite après une certaine incubation qui permet la sédimentation spontanée des hématies au fond du tube.

De multiples petites modifications ont été apportées par des auteurs sans toucher au principe de la réaction. Les différences essentielles portent sur la concentration des hématies, dont la diminution augmente la sensibilité du test : une concentration à 0,5 % aboutissant à une dilution finale de 0,25 % permet une lecture facile et nette.

Au laboratoire d'Hygiène, deux techniques différentes sont utilisées :

— La première est l'adaptation sur lame de la méthode préconisée par HIMMELWEIT (1949). Elle donne des résultats immédiatement exploitables et présente un grand intérêt pour un titrage des liquides au point de vue de leur pouvoir agglutinant. Elle donne des résultats comparables à ceux fournis par la méthode en tubes.

— La deuxième est la classique méthode en tubes de SALK, mettant en présence des dilutions croissantes de la suspension virale à partir d'une dilution de base 1/10, sous un volume de 0,25 ml..

et 0,25 ml. d'une suspension d'hématies de poule à 0,5 %. La lecture se fait au miroir concave après sédimentation de une heure et quart.

La première méthode est d'une grande utilité pour le tri des liquides infectés mais n'a qu'une valeur d'orientation. La deuxième se prête parfaitement à des titrages en grande série et possède une précision appréciable.

Spécificité du phénomène d'hémagglutination.

Si le test d'agglutination directe des hématies sensibles par le virus grippal est une méthode simple et rapide de contrôle du résultat d'un isolement, la preuve de la présence du virus est seulement présumptive et demande à être vérifiée par les tests de spécificité qui permettent d'exclure les causes d'erreur : réaction d'inhibition, réaction de fixation du complément, neutralisation de la multiplication virale « in ovo » pratiquées en présence d'un antisérum spécifique.

Les causes d'erreur, en effet, sont multiples :

— L'hémagglutination peut être due à un autre virus agglutinant (surinfection dans un laboratoire où l'on manipule plusieurs virus).

— Une contamination par des micro-organismes figurés peut agglutiner des hématies de poule (SALK et coll. 1945 - FLORMAN, 1946).

— La cause essentielle qui peut troubler l'interprétation d'une agglutination est la présence d'agglutinines naturelles dans l'œuf (Commission of Acute Respiratory Diseases, 1946). En effet, il existe une agglutinine dans le liquide amniotique d'un œuf normal après le onzième jour d'incubation, active sur les hématies humaines mais non sur celles de poule.

— Enfin, une pseudo-agglutination peut être due à la présence de traces de cuivre dans l'eau distillée employée (SAUTTER et LÉPINE, 1948).

B. - LA REACTION D'INHIBITION

I. L'inhibition spécifique :

Mc CLELLAND et HARE (1941) ont eu l'idée d'appliquer l'agglutination des hématies à la détermination du taux d'anticorps que peut renfermer le sérum d'un malade, en mettant en évidence la neutralisation du virus grippal par les anticorps.

Mais c'est surtout HIRST qui, par ses travaux (1942), a contribué à démontrer la valeur de la méthode, à en fixer la technique et en généraliser l'emploi. Après lui, de nombreux auteurs l'ont utilisée et l'utilisent encore pour déceler l'infection grippale dans ses diverses manifestations chez l'homme et l'ont comparée aux autres tech-

niques immunologiques proposées. Mais avant de conclure sur sa valeur, il importe de parler des difficultés rencontrées au cours de sa mise en œuvre par différents auteurs.

II. L'inhibition non spécifique :

Il est apparu très vite que de nombreux facteurs peuvent gêner l'appréciation de la spécificité de l'inhibition de l'héماغglutination.

BEVERIDGE et LIND (1946) signalent la présence d'inhibiteurs non spécifiques dans l'œuf embryonné non infecté entre le 13^e et le 16^e jour d'incubation, qu'on peut neutraliser par du virus vivant.

FRANCIS (1947) observe la présence d'inhibiteurs non spécifiques dans le sérum normal. Par la suite, deux groupes d'inhibiteurs sériques ont été décrits :

— Un composant thermolabile, isolé par Mc CREA (1946), facilement éliminé par simple chauffage à 60° pendant 20 minutes (BEVERIDGE et LIND, 1946).

— Un composant thermostable, de nature polysaccharidienne (Mc CREA, 1948 a) dont l'élimination pose des problèmes plus complexes, résolus par les recherches de BURNET et coll. (1947), ANDERSON (1948), Mc CREA (1948 b) et HIRST (1948) : elles ont mis en évidence que les substances inhibitrices peuvent être neutralisées par contact avec du virus vivant, par un extrait de vibron cholérique, par un excès de périodate de sodium ainsi que par des ferments protéolytiques (trypsi-ne).

III. Techniques de la réaction d'inhibition de l'héماغglutination :

Comportant de nombreuses variantes, elles dérivent toutes de celle proposée par SALK (1944). La technique utilisée au laboratoire d'Hygiène de la Faculté de Médecine de Lyon est celle recommandée par le Comité d'Experts de la Grippe de l'Organisation Mondiale de la Santé dans sa session de 1952. Nous n'en donnerons donc pas la description, d'ailleurs rapportée dans tous ses détails dans l'ouvrage de P. LÉPINE et R. SOHIER (1954). SALK (1948) a préconisé l'emploi de plateaux en matière plastique au lieu de tubes à héماغlyse.

IV. Résultats obtenus par la méthode :

Il ne saurait être question d'exposer en détail, même de façon succincte, les résultats obtenus par une technique utilisée depuis 1942 dans tous les pays du monde. Citons parmi les travaux les plus récents, ceux de CATEIGNE et coll. (1953), de PONTECORVO (1953), HILLEMANN et coll. (1953) et surtout une étude critique complète de l'héماغglutination et ses applications pratiques entreprise à Milan par COMANDINI (1952 a et b). Nous n'avons personnellement pas utilisé cette réaction pour l'étude de nos épidémies, sauf pour la détermination exacte des souches en cause.

V. Valeur de la méthode :

De l'ensemble des travaux poursuivis par cette méthode il ressort que c'est une réaction dont la mise en œuvre est délicate ; elle présente en effet des difficultés techniques qui tiennent à plusieurs facteurs :

1. - *Hémagglutinines* : De préparation difficile, elles doivent être titrées contre des anti-sérums spécifiques pour chacune d'elles, eux-mêmes difficiles à obtenir.

Surtout, la haute spécificité de la réaction d'inhibition, spécificité de type et non simplement de groupe, si elle permet le typage des souches, se retourne contre elle lorsqu'il s'agit d'établir un diagnostic. En effet, dans l'ignorance où l'on est de la souche responsable si celle-ci n'a pas encore été déterminée, le résultat obtenu dépend d'une éventuelle identité entre le virus infectant et celui utilisé dans le test. Il faut donc pratiquer la réaction simultanément avec le plus grand nombre d'hémagglutinines possible, au minimum 3 du groupe A et 2 du groupe B. Encore a-t-on constaté que, paradoxalement, l'hémagglutinine préparée à partir de la souche même de l'épidémie pouvait donner de moins bons résultats que d'autres (STUART-HARRIS et MILLER, 1947). Aussi les statistiques comportent-elles souvent, avec cette méthode, un pourcentage important d'erreurs par défaut (LÉPINE et coll. 1949).

2. - *Hématies* : BEVERIDGE et LIND (1946) ont observé que des variations de titre considérables pouvaient survenir avec différents échantillons d'hématies provenant de la même espèce animale (Titre variant du 1/25 au 1/100 pour 33 échantillons testés avec le même virus). De plus, une saignée trop souvent répétée de la même poule peut introduire une cause d'erreur par le fait que les formes jeunes de régénération des hématies n'ont pas le même comportement que les hématies adultes.

3. - Surtout cette réaction est grevée de tous les *facteurs non spécifiques* qui viennent interférer sur l'hémagglutination elle-même et sur son inhibition spécifique par les anticorps sériques. Les inhibiteurs non spécifiques des sérums, en particulier, rendent pratiquement obligatoire leur élimination par des traitements assez laborieux.

Ainsi HILLEMANN et coll. (1953) ont vu que, pour la souche PR8, 16 sérums d'enfants, non traités, présentaient un titre moyen d'inhibition de 1/160 alors qu'ils donnaient un titre non significatif après traitement par filtrat de vibrion cholérique. Les souches WS, FM1, LEE et IBI étaient également très affectées par les substances non spécifiques mais à un moindre degré. La souche C, par contre, n'était pas influencée.

Ces variations dans les résultats obtenus entraînent d'une part la difficulté de reproduire la réaction dans un même laboratoire à des moments différents et, à plus forte raison, dans des laboratoires différents, d'autre part la nécessité absolue, pour établir un diagnostic, de comparer les titres de deux prélèvements effectués au début et à la période de convalescence de l'affection. Cette nécessité est encore plus impérative si l'on tient compte que les anticorps inhibant l'héماغglutination engendrés par une atteinte de grippe persistent assez longtemps après la guérison dans le sérum des sujets pour qu'on ne puisse en aucun cas attribuer une valeur à un titre élevé découvert sur un unique échantillon pour le diagnostic d'une infection récente.

Pour toutes ces raisons, la réaction d'inhibition de l'héماغglutination apparaît de plus en plus comme devant céder le pas, pour le diagnostic clinique, à la réaction de fixation du complément. Une étude comparée des deux méthodes sera envisagée dans un prochain chapitre.

Par contre, elle apparaît actuellement irremplaçable pour une étude immuno-épidémiologique : La persistance des anticorps inhibant l'héماغglutination permet en effet l'étude statistique de l'immunité d'une population par une enquête sérologique systématique (MILLEMAN et coll. 1953). Surtout par sa haute spécificité, elle apporte pour le typage des souches des renseignements qu'aucune autre méthode ne saurait fournir.

CHAPITRE IV

MÉTHODES INDIRECTES DE DIAGNOSTIC SPÉCIFIQUE : MÉTHODES SÉROLOGIQUES :

II. RÉACTION DE FIXATION DU COMPLÉMENT

PRÉPARATION DES ANTIGÈNES

La découverte par BORDET (1939) de la fixation du complément sur les complexes antigène-anticorps a été appliquée au diagnostic des infections à virus. SMITH (1936), le premier, utilisa comme antigènes grippaux des suspensions d'organes virulents. Mais la valeur des résultats était discutée et beaucoup étaient considérés comme non spécifiques, malgré des travaux intéressants repris par HOYLE et FAIRBROTHER (1937).

Une étape nouvelle est franchie lorsqu'on parvient à purifier ces antigènes des substances tissulaires qu'elles contenaient (KNIGHT, 1946 - HOYLE, 1948 a).

Parallèlement, l'application à l'étude des virus de la culture sur œuf de poule par GOODPASTURE, offrait une source importante d'antigènes (NIGG et coll. 1940 - BURNET, 1940).

On s'aperçut rapidement que l'antigène peut être dissocié des particules de virus (HOYLE et FAIRBROTHER, 1937), car il est de très petite taille et se comporte comme un antigène soluble (LENNETTE et HORSFALL, 1940) spécifique du type antigénique du virus, mais non de la variété dans le type (LENNETTE et HORSFALL, 1941). Il existe pourtant une fraction antigène fixant le complément qui est attachée à la particule de virus et dont la spécificité étroite est comparable à celle obtenue dans la réaction d'inhibition de l'hémagglutination (FRIEDEWALD, 1943).

Les recherches des dernières années ont eu en vue de parfaire la purification des antigènes (HOYLE, 1945-1948 a) et aussi de préciser les modalités de formation de ces antigènes dans les tissus infectés. WIENER et coll. (1946), HENLE et HENLE (1949), HOYLE (1948 b - 1953 a, 1953 b), ont précisé le cycle du développe-

ment du virus dans l'œuf : Inoculé dans la cavité allantoïque, il est repris par les cellules bordantes de la membrane chorio-allantoïque et transformé en une forme intra-cellulaire non infectieuse, non agglutinante, identique à l'antigène soluble, qui se multiplie pendant 6 heures au bout desquelles le virus infectieux réapparaît, passe dans le liquide allantoïque et recommence le cycle. WYCKOFF enfin (1951-1953), suit le phénomène au microscope électronique et voit que les cellules de la membrane chorio-allantoïque déversent le virus infectieux dans le liquide allantoïque, en émettant des protrusions cytoplasmiques sphériques qui présentent les caractères du virus lui-même. Ces études ont l'intérêt de préciser à quel moment après l'inoculation tel ou tel type d'antigène est produit en quantité maxima.

Ainsi, on dispose actuellement d'antigènes dûment purifiés qui permettent le diagnostic au laboratoire de façon satisfaisante.

Au laboratoire d'Hygiène de la Faculté de Médecine de Lyon, deux types d'antigènes ont été utilisés :

En 1953 ont été utilisés des antigènes de poumon de souris préparés au laboratoire par le docteur J. BUISSIÈRE, suivant la technique de HOYLE (1948 a), comportant une séparation de l'antigène soluble par addition de chloroforme, passage d'une nuit au réfrigérateur, et centrifugation. Ces antigènes ont donné des résultats comparables à ceux obtenus, à partir de 1954, par l'emploi d'antigènes préparés à partir de membranes d'œuf infecté. Pour la préparation de ces derniers, on a suivi les deux techniques préconisées par le Comité d'Experts de l'O.M.S. (1952) :

La méthode A : Prélèvement des membranes après incubation de 48 heures, congélations et décongélations successives, centrifugation, addition de chloroforme et nouvelle centrifugation, le surnageant constituant l'antigène soluble. Cette méthode nous a permis de préparer un antigène du type A à partir d'une souche PR8.

La méthode B : comporte une inoculation massive (dont l'intérêt est d'inhiber la formation des hémagglutinines), et une récolte précoce après 6 heures. Les membranes lavées et broyées sont centrifugées. Leur infectiosité est détruite par passage aux rayons ultraviolets. Cette technique nous est apparue plus propre à la préparation d'un antigène du type B à partir d'une souche LEE, que la méthode A qui nous a donné un échec.

TECHNIQUE DE LA REACTION

Techniques proposées :

La technique originale de HOYLE, publiée en détail en 1948 (a), comportait des modalités techniques qui n'ont guère été modifiées depuis ; mise en œuvre avec l'antigène de poumon purifié, elle com-

portait, outre la technique standard (réactifs sous un volume uniforme de 0,2 ml.), une technique à volume réduit (0,1 ml.) et une micro-méthode (0,05 ml.).

La technique recommandée par le Comité d'Experts de la Grippe (BULLETIN de l'O.M.S., 1952) n'en diffère que par l'antigène utilisé (antigène de membrane chorio-allantoïque d'œuf infecté).

Techniques personnelles :

En 1953, nous avons utilisé la micro-méthode de HOYLE comportant l'emploi de l'antigène de poumon de souris sous un volume de 0,05 ml.

Par la suite, nous avons essayé la méthode sur plaques de plexiglass recommandée par LÉPINE et coll. (1953), inspirée par FULTON et DUMBELL (1949) ; nous nous sommes alors heurtés à des difficultés qui tenaient surtout au fait que nous n'avons pu réunir le matériel requis pour la mise en œuvre correcte de la réaction suivant la méthode originale ; faute de bacs étanches et d'étuves rigoureusement réglées ; les gouttes déposées sur les plaques étaient soumises à une évaporation qui perturbait la réaction ; abandonnant la méthode, nous avons toutefois essayé d'adopter pour la répartition en tubes l'emploi des pipettes compte-gouttes utilisées dans cette technique, ce qui nous permettait de réduire la quantité des réactifs, tout en évitant les inconvénients de leur étalement ; cette technique ayant les caractéristiques générales de celle utilisée en 1953, sauf en ce qui concerne les quantités de réactifs, nous en exposerons les détails :

I. — TITRAGE DU COMPLEMENT.

Matériel :

Tubes dits à hémolyse 15 × 65 mm. ;

Tubes spéciaux : 9 × 65 mm. ;

Portoirs : Pour tubes à hémolyse : 3 à 12 trous,

Pour tubes spéciaux : 1 à 24 trous ;

Pipettes de 2 ml. graduées au 1/20^e ;

Pipettes compte-gouttes spéciales donnant 45 à 50 gouttes au ml. :

On les fabrique en prenant des pipettes Pasteur finement étirées dont l'on engage l'effilure dans la fente d'une plaque de duralumin et dont on casse l'extrémité ; il faut ensuite jauger ces pipettes et en préparer plusieurs donnant exactement le même nombre de gouttes pour le cas où celle utilisée au cours d'une épreuve serait brisée.

Réactifs :

Complément : sérum de plusieurs cobayes mâles, conservé à — 20° C. ;

Hématies : suspension d'hématies de mouton conservées en liquide d'Alsever (1), lavées et diluées (voir plus loin) ;

Solution tampon véronal avec calcium et magnésium (2).

Préparation des réactifs :

1. - Préparation des dilutions de complément.

On prépare 3 portoirs, A, B, C, contenant chacun 5 tubes à hémolyse numérotés de 1 à 5, qu'on place de façon à mettre en regard les tubes homologues.

On répartit d'abord la solution tampon véronal :

Portoir A : 1^{er} tube : 1 ml. ; 2° : 1,25 ; 3° : 1,50 ; 4° : 1,75 ; 5° : 2.

Portoirs B et C : 0,50 ml. dans tous les tubes.

On répartit ensuite le complément :

Portoir A : A partir d'une dilution au 1/5, on répartit 0,25 ml. dans chacun des tubes. On agite.

Portoir B : On prélève dans chaque tube homologue du portoir A, 0,50 ml. du complément dilué et on les reporte dans le tube correspondant du portoir B.

Portoir C : On répète l'opération en prélevant 0,50 dans les tubes du portoir B et en les reportant dans les tubes correspondants du portoir C.

Ces opérations sont représentées dans le tableau suivant :

		1	2	3	4	5
A	C' dilué au 1/5	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
	Sol. T. V.	1	1,25	1,50	1,75	2
	Dilution obtenue	1/25	1/30	1/35	1/40	1/45
B	C' dilué du tube homologue de A	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
	Sol. T. V.	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
	Dilution obtenue	1/50	1/60	1/70	1/80	1/90
C	C' dilué du tube homologue de B	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
	Sol. T. V.	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
	Dilution obtenue	1/100	1/120	1/140	1/160	1/180

(1) Solution d'Alsever : dextrose anhydre : 20,05 g. - ClNa : 8 g. - Citrate trisodique (5 H²O) : 4,2 g. - Eau distillée : 1.000 ml. - Le pH doit être ajusté à 6,1 avec une solution d'acide citrique à 5 % ; stérilisation à la chaleur 3 jours de suite à 100° pendant 30 minutes. Le mélange se fait à volume égal de sang et de liquide conservateur.

(2) Solution de tampon véronal : Solution-mère : ClNa : 85 g. - Véronal : 5,75 g. - Véronal sodique : 3,75 g. - Dissoudre l'acide dans 500 ml. d'eau distillée ; compléter à 2.000 ml. ; ajouter : ClMg : 1,68 g. - Cl²Ca : 0,28 g. - Autoclaver 20 minutes à 105°. - Conservation à 4° et pH : 7,2. - Au moment de l'emploi, diluer au 1/5 en eau distillée.

2. - Préparation de la suspension d'hématies :

Nous avons adopté, pour la préparation d'une suspension standard d'hématies, la technique de COLLIER et coll. (1952) ;

Hématies de mouton conservées à 4° en solution d'ALSEVER ; centrifuger à 3.000 tours (centrifugeuse horizontale) pendant 10 minutes et laver 3 fois dans la solution T.V. ; décanter et faire une suspension à 10 %. Prélever 4 ml. de cette suspension et les porter dans un tube à hématocrite. Centrifuger 15 minutes à 5.000 tours. Calculer le pourcentage réel de la suspension d'après le culot obtenu pour 4 ml. Ajouter à la suspension à 10 % du tampon véronal pour obtenir une suspension à 2 % en utilisant la formule :

$$V \times \frac{\%}{2} - V = X$$

où V : volume de la suspension à 10 % à laquelle on rajoutera X de solution T.V.

Titrage de l'activité du complément en présence d'antigène :

Son but est de déterminer la dose de complément qui permet l'hémolyse totale d'une quantité fixe d'hématies en présence des deux antigènes A et B utilisés dans la réaction. On place sur un portoir ordinaire les 15 dilutions de complément précédemment préparées et on dispose, sur deux portoirs spéciaux, 15 tubes spéciaux pour chaque antigène placés en regard des dilutions homologues. On reporte chaque dilution de complément dans les deux tubes homologues, sous un volume uniforme de 1 goutte, à la pipette compte-goutte spéciale. On obtient ainsi deux galeries de 15 tubes chacune contenant les 15 dilutions croissantes du complément. Il faut prendre soin de commencer la répartition par les dilutions les plus élevées.

On ajoute ensuite dans une galerie l'antigène A, dans l'autre l'antigène B, à raison de 1 goutte dans tous les tubes sous une dilution uniforme déterminée préalablement par un titrage effectué suivant la méthode de BOERNER-LUKENS (voir plus loin, p. 49).

On ajoute enfin dans tous les tubes 1 goutte de solution tampon-véronal.

On agite et on porte au bain-marie pour une heure. On ajoute alors dans tous les tubes 11 gouttes d'un mélange à parties égales de la suspension d'hématies à 2 % du culot et d'une solution de sérum hémolytique contenant 4 doses minima hémolytiques (voir plus loin, p. 49).

On reporte alors au bain-marie à 37° pour une heure, mais on fait une première lecture après une demi-heure et une deuxième après une heure, à titre de contrôle.

Au total, les opérations sont les suivantes :

Pour chaque dilution du complément :

C' 1 goutte ;

Ag 1 goutte ;

T.V. 1 goutte ;

Une heure au bain-marie à 37°.

Hématies sensibilisées : II gouttes.

Une heure au bain-marie à 37°.

L'unité de complément est donné par la dilution la plus élevée qui provoque l'hémolyse totale après une heure. Pour la réaction, on utilise 2 unités sous le volume de 1 goutte, c'est-à-dire qu'on emploie une dilution égale à la moitié de celle qui a provoqué l'hémolyse totale.

II. — REACTION.

Préparation des réactifs :

1. - *Dilution des sérums à expertiser et des sérums de référence* : Elle est faite au rhéomètre de VERNES, à partir d'une dilution initiale du 1/8 faite à la pipette (sérum pur : 0,1 - T.V. : 0,7 ml.). On prépare ainsi des dilutions en progression géométrique de raison 2 allant du 1/8 au 1/1.024.

2. - *Antigène* : Il est dilué de telle sorte qu'il contienne 2 unités, soit la concentration double de la solution la plus élevée qui, dans le titrage précédemment effectué par la méthode du damier de BOERNER-LUKENS, a porté à son maximum le titre d'un sérum de référence connu (voir p. 49).

3. - *Complément* : On fera une dilution de telle sorte qu'une goutte contienne 2 unités (soit 2 fois plus concentré que la dilution qui a permis l'hémolyse totale lors du titrage du jour).

4. - *Système hémolytique* : Le même que celui utilisé pour le titrage du complément.

Répartition des réactifs :

Pendant que se poursuit le titrage du complément, on prépare les dilutions des sérums et on les reporte, à raison de 1 goutte, dans autant de tubes spéciaux en commençant pour chaque sérum par la répartition de la dilution la plus élevée ; en outre, on prévoit, pour chaque sérum, deux tubes dits « témoins sérum » où l'on reporte les dilutions au 1/8 et au 1/16 (recherche du pouvoir anticomplémentaire du sérum).

On répartit ensuite l'antigène, à raison d'une goutte, dans tous les tubes sauf les deux témoins, et enfin le complément, à raison d'une goutte dans tous les tubes y compris les témoins-sérums. On complète le volume des tubes témoins-sérum à trois gouttes en ajoutant une goutte de T.V.

Outre les témoins propres à chaque sérum, il faut prévoir des témoins dits « généraux », destinés à contrôler que le système hémolytique ne varie pas, que le complément est bien présent à deux unités à la fin de la réaction, enfin que l'antigène n'a pas de pouvoir anticomplémentaire ni de pouvoir hémolytique. La mise en place de ces témoins généraux est représentée dans le tableau ci-dessous (voir p. 48).

Il faut noter que les témoins généraux exigent, outre du complément à 2 unités, du complément contenant 1 et 1/2 unité ce qui oblige à préparer une petite quantité de complément à des dilutions égales à la moitié et au quart de celle utilisée dans l'ensemble de la réaction.

Lorsque sont répartis les dilutions de sérum, l'antigène, le complément et le T.V., on agite les portoirs et on les porte au bain-marie à 37° pour une fixation d'une heure. On ajoute alors dans tous les tubes, 11 gouttes de la suspension d'hématies sensibilisées : les quantités de réactifs et l'ensemble des opérations sont indiqués dans le tableau ci-dessous.

Dans nos tableaux, les abréviations ont la signification suivantes :

Ag : antigène - C' : complément - T.V. : tampon véronal - G.R. Sens : hématies sensibilisées - A + C' : Témoin vérifiant le pouvoir du complément en présence de l'antigène - C.H. : témoin vérifiant le pouvoir du complément sur le couple hémolytique en l'absence d'antigène - A — C' : témoin vérifiant que l'antigène n'a pas de pouvoir hémolysant en l'absence de complément - T.H. : témoin hématies vérifiant que les hématies n'hémolysent pas spontanément.

REACTION

POUR CHAQUE SERUM :

	TUBES	DE	RÉACTION	TÉMOINS SÉRUMS
Sérum dilué au	1/8	1/16	 1/1024	1/8 1/16
Sous un vol. de	I	I	I	I I
Antigène	I	I	I	I I
C' (2 unités)	I	I	I	I I
T. V.	—	—	—	I I

Incubation une heure au bain-marie à 37°

G. R. sensib.	II	II	II	II II
--------------------	----	----	----	------------

Hémolyse 30 minutes au bain-marie à 37°.

TEMOINS GENERAUX (pour l'ensemble de la réaction) :

	$\frac{1}{2}$ unité de C'		1 unité de C'		2 unités de C'		A-C'	TH
	Ag+C'	CH	Ag+C'	CH	Ag.+C'	CH		
Ag.	I	—	I	—	I	—	I	—
C' (2 unités)	—	—	—	—	I	I	—	—
C' (1 unité)	—	—	I	I	—	—	—	—
C' (1/2 unité)	I	I	—	—	—	—	—	—
T. V.	I	II	I	II	I	II	II	III

Incubation une heure au bain-marie à 37°.

G. R. sensibil. II II II II II II II II

Hémolyse 30 minutes au bain-marie à 37°.

Modalités de lecture :

On surveille le déroulement de la réaction et on fait une première lecture dès que l'hémolyse est totale dans les témoins généraux contenant du complément à deux unités, et dans les témoins-sérums ; on refait une deuxième lecture à la 30^e minute ; si le titrage du complément a été convenable, il doit y avoir hémolyse totale dans les témoins généraux (A+C' et C.II.) contenant deux unités de complément, partielle dans ceux contenant une unité, et nulle dans ceux contenant une demi-unité ; le témoin antigène (A — C') et le témoin hématies (T.H.) ne doivent pas hémolyser.

Pour chaque tube, la lecture est faite par transparence et nous avons l'habitude de distinguer 4 degrés de positivité :

- 0 ou 100 % : Hémolyse totale.
- (±) : Douteux ; le liquide n'est pas parfaitement clair.
- (+) ou 1 ou 75 % : Le liquide présente un louche certain ; un barreau regardé à travers lui n'est pas vu parfaitement net.
- (++) ou 2 ou 50 % : Le barreau est vu très estompé à travers le liquide.
- (+++) ou 3 ou 25 % : Le liquide est légèrement translucide sans qu'on puisse apercevoir le barreau.
- (++++) ou 4 ou 0 % : Absence totale d'hémolyse.

Nous ne retenons comme positifs que les tubes présentant une réaction à 3 ou 4 après 30 minutes (2^e lecture).

Pour que l'ensemble de l'épreuve soit valable, nous exigeons enfin que deux sérums de référence connus pour être positifs retrouvent leur titre exact. Une variation de ce titre de plus d'un tube fait rejeter l'ensemble de la réaction. Par ailleurs, un sérum de référence connu pour être négatif ne doit montrer aucune fixation.

III. — TITRAGE DU SÉRUM HÉMOLYTIQUE.

Il consiste à déterminer la quantité minima de sérum hémolytique qui permet l'hémolyse totale en présence d'un excès de complément. Le titrage est effectué une fois pour toutes, à chaque nouveau lot de sérum hémolytique. On utilise le sérum hémolytique dit concentré fourni par l'Institut Pasteur (titre indiqué : 1/10.000). On prépare dans des tubes à hémolyse ordinaires une série de dilutions de sérum hémolytique allant du 1/300 au 1/16.000 en progression à peu près arithmétique. On reporte chaque dilution dans une série de tubes à hémolyse, à raison de 0,1 ml. On répartit ensuite dans chaque tube 0,1 ml. de complément au 1/20 ou au 1/30. On complète par 0,2 ml. de tampon véronal ; on ajoute enfin 0,1 ml. d'une suspension d'hématies de mouton à 2 % du culot (calculés à l'hématocrite) ; on agite vigoureusement et on porte au bain-marie à 37° pour une heure. Les quantités de réactifs présents dans chaque tube sont les suivantes pour chaque dilution de sérum hémolytique (en ml.) :

Sérum hémolytique	: 0,1
Complément au 1/20 ou au 1/30	: 0,1
Tampon véronal	: 0,2
Suspension d'hématies	: 0,1
Volume total	: 0,5

Il faut noter que la proportion de la suspension d'hématies par rapport au volume total est de 1 à 5 comme dans le titrage du complément et la réaction. Après un séjour d'une heure au bain-marie, la dilution la plus élevée qui détermine une hémolyse totale représente la dose minima hémolytique (M.H.D.). Pour le titrage du complément et la réaction, on utilise 4 M. H. D., c'est-à-dire une dilution 4 fois plus faible que celle qui a déterminé l'hémolyse totale.

IV. — TITRAGE DES ANTIGÈNES.

La méthode utilisée au laboratoire d'Hygiène est inspirée de celle préconisée par BOERNER et LUKENS (1937), pour le titrage de l'antigène syphilitique. Pour chaque antigène à titrer, nous utilisons 3 sérums dits de référence dont le titre, préalablement déterminé en présence d'un antigène de référence, est nul pour le premier (témoin négatif), moyen pour le deuxième et fort pour le troisième. (Ce sont ces mêmes sérums de référence qui sont introduits à titre de contrôle, dans chaque épreuve de diagnostic en série.)

Suivant la technique déjà décrite, on pratique sur chaque sérum autant de réactions qu'il y a de dilutions d'antigène : celui-ci est introduit aux dilutions successives suivantes : pur, $1/2$, $1/4$, $1/8$, $1/16$, etc.

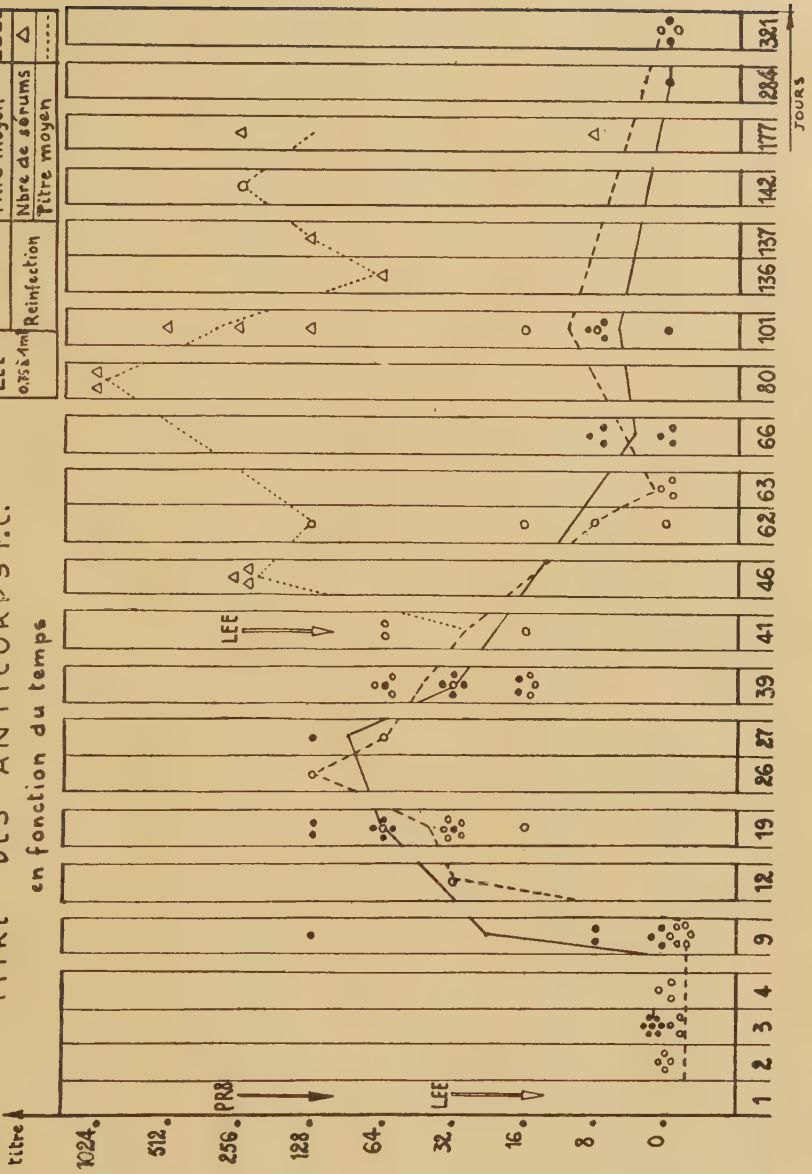
On choisit comme dose d'antigène à utiliser dans les réactions, le double de la dose la plus faible qui permet aux sérums de retrouver leur titre exact, c'est-à-dire qu'on emploie l'antigène à une dilution égale à la moitié de la dilution maxima possible indiquée par le titrage. Il est, en effet, préférable d'opérer en présence d'un excès d'antigène pour éviter le phénomène de zone, que nous n'avons jamais constaté avec cette technique.

V. — OBTENTION ET CONSERVATION DES SERUMS DE REFERENCE.

Nous utilisons indifféremment, comme sérums de référence, soit les sérums de malades convalescents dont le premier titrage effectué en vue du diagnostic de grippe, a révélé un titre élevé, soit des sérums d'animaux infectés expérimentalement : le cobaye, animal non réceptif, élabore cependant des anticorps qui peuvent atteindre un titre élevé. Nous avons obtenu de bons résultats par instillation intra-nasale de 0,5 à 1 ml. de liquide allantoïque infecté sous anesthésie à l'éther : les anticorps atteignent leur titre maximum vers le 20^e jour pour s'abaisser ensuite et disparaître vers le 100^e jour. Si le titre obtenu par une primo-infection est jugé insuffisant, il est possible de provoquer une ascension plus importante par une deuxième instillation.

Nous avons représenté dans le graphique II les résultats de cette immunisation active. Dans ce graphique, un cas particulier doit être signalé : L'un des cobayes inoculé une première fois par le liquide infectant LEE (grippe B), présentait une montée d'anticorps qui s'intégrait normalement dans la courbe du titre moyen, puisque son sérum titrait $1/64$ du 9^e au 39^e jour ; brusquement, sur deux prélèvements ultérieurs, nous avons vu le titre de ses anticorps s'élever au $1/128$ puis au $1/256$, bien qu'il n'ait pas subi de réinoculation, au lieu de redescendre comme le voudrait la courbe du titre moyen dressé par l'étude de l'ensemble des autres cobayes ; en revanche, ces deux résultats s'intègrent dans la courbe du titre moyen des sérums de cobayes réinoculés : nous en avons conclu que ce cobaye avait été réinfecté, probablement par contact avec un de ses congénères expérimentalement réinoculés, et nous avons compté ces deux prélèvements aberrants comme appartenant à un cobaye réinfecté, pour la détermination des courbes de titre moyen. Ainsi rectifiées, les courbes d'évolution des titres moyens chez le cobaye expérimentalement immunisé montrent la concordance entre les résultats obtenus avec la souche PR8 et la souche LEE ; pour celle-ci, le graphique montre également l'effet de stimulation notable d'une réinoculation sur le titre.

IMMUNISATION ACTIVE DU COBAYE :
(Instillation intranasale de liquides allantoïques infectés)
TITRE DES ANTICORPS F.C.



Graphique II.

Nous conservons nos sérums de référence par congélation rapide à -25° après répartition fractionnée en petits tubes scellés de 0,2 ml. environ, quantité suffisante pour une réaction ; de cette manière, les quelques millilitres de sérum obtenus à partir d'un malade convalescent ou d'un cobaye infecté nous permettent d'utiliser les mêmes sérums de référence pendant très longtemps : Nous avons vérifié que la plupart de ces sérums conservés à -25° conservent leur titre immuable pendant plusieurs mois (voir p. 83). Il n'en est pas de même des sérums conservés tels quels au réfrigérateur à $0+4^{\circ}$, qui deviennent rapidement anticomplémentaires.

Il faut noter qu'avant d'être introduits dans une réaction, les sérums doivent être inactivés par passage de 20 minutes au bain-marie à 56° pour les sérums humains et à 62° pour les sérums animaux.

INTERET DIAGNOSTIQUE DE LA REACTION

Lors des épidémies de grippe qui ont sévi dans la région lyonnaise en 1953 et 1955, il a été pratiqué au laboratoire d'Hygiène de la Faculté de Médecine de Lyon, environ 1.000 réactions de fixation du complément dans le but d'apporter au médecin une précision de laboratoire sur la nature exacte d'affections aiguës des voies respiratoires pouvant relever, entre autres étiologies virales, des virus de la grippe. Sur ce nombre, le diagnostic de grippe a pu être retenu dans 199 cas, dont 178 gripes à virus du groupe A (s'avérant être du type A' après mise en œuvre de méthodes complémentaires), et 21 gripes à virus du groupe B, parmi les 260 sujets ayant présenté une fixation positive à quelque degré.

Les recherches portaient sur deux catégories de malades :

— Ceux pour lesquels nous disposions de deux ou plusieurs prélèvements effectués au début, au cours ou au décours de la maladie.

— Ceux pour lesquels nous ne disposions que d'un seul sérum.

Pour ces sujets, l'étude de la répartition des titres maxima obtenus par la réaction de fixation du complément (titre, exprimé par la dilution la plus élevée donnant un empêchement d'hémolyse d'au moins 75 %) donne les résultats suivants :

— Sujets dont le sérum le plus positif fixe le complément en présence d'un antigène de groupe A :

Positifs au $1/8$: 38 ; au $1/16$: 36 ; au $1/32$: 36 ; au $1/64$: 31 ; au $1/128$: 39 ; au $1/256$: 28 ; au $1/512$: 7 ; au $1/1024$: 1 ; total : 216.

— Sujets dont le sérum le plus positif fixe le complément en présence d'un antigène de groupe B :

Positifs au $1/8$: 16 ; au $1/16$: 11 ; au $1/32$: 7 ; au $1/64$: 1 ; au $1/128$: 4 ; au $1/256$: 4 ; total : 44.

I. — LES CRITERES DE POSITIVITE DE LA REACTION

A. — OBSERVATIONS EN DEUX TEMPS.

La meilleure méthode permettant d'affirmer un diagnostic d'infection grippale consiste à pratiquer la réaction sur 2 échantillons de sérum prélevés au cours et au décours de la maladie et à comparer leurs titres qui doivent, pour être significatifs suivant la plupart des auteurs, être dans le rapport du simple au quadruple.

Nos malades répondant à ces conditions comprennent :

1. - Sujets dont le virus a été isolé :

Présentant tous les critères exigés pour affirmer le rôle du virus :

- Isolement d'une souche de virus.
- Argument clinique.
- Argument épidémiologique.
- Argument sérologique.

Pour 4 sujets à partir desquels une souche a été isolée, la réaction de fixation du complément a donné les résultats suivants :

— PEN...,	début le	10-2-53	F.D.C.* :	12-2-53 : 0 18-2-53 : 1/512 1-3-53 : 1/256	} Souche isolée : Type A'
— LAV...,	d°	18-2-55		20-2-55 : 0 1-3-55 : 1/512 11-3-55 : 1/512 16-3-55 : 1/512	
— RAB...,	d°	26-2-55		28-2-55 : 0 8-3-55 : 1/128 10-3-55 : 1/64 9-6-55 : 0	
— DE POU.,	d°	24-3-55		26-3-55 : 0 31-3-55 : 1/64 31-5-55 : 1/8 17-6-55 : 0	

* Lire désormais : Réaction de fixation du complément.

II. - Sujets pour lesquels existaient seulement les arguments :

- Clinique.
- Epidémiologique.
- Sérologique (variation du titre du simple au quadruple*).

Grippe à virus du groupe A :

Nombre de sujets ayant atteint au moins une fois le taux de :
1/16 : 15, soit 13,52 % ; 1/32 : 23, soit 20,72 % ; 1/64 : 23, soit 20,72 % ; 1/128 : 31, soit 27,92 % ; 1/256 : 14, soit 12,61 % ; 1/512 : 4, soit 3,60 % ; 1/1.024 : 1 soit 0,90 %. Total : 111 sujets.

Grippe à virus du groupe B :

Nombre de sujets ayant atteint au moins une fois le taux de :
1/16 : 4 ; 1/32 : 2 ; 1/64 : 0 ; 1/128 : 4. Total : 10 sujets.

Nous avons donc détecté un nombre restreint de gripes à virus B ; encore faut-il y comprendre un sujet qui avait présenté en même temps une variation du titre des anticorps en présence d'un antigène du groupe A.

Les résultats pour la seule grippe à virus du groupe A sont représentés dans le graphique III (barres hachurées).

B. — OBSERVATION EN UN TEMPS.

(Essai sur le titre significatif)

Si la meilleure méthode de diagnostic sérologique de la grippe par la FDC consiste à comparer le titre des anticorps de deux sérums, l'un dit « précoce », prélevé au début de la maladie, l'autre dit « tardif », prélevé à son décours, il est souvent difficile d'obtenir du médecin que les prélèvements soient pratiqués dans les délais requis ; le plus souvent on ne dispose que d'un ou deux échantillons prélevés à un stade tardif de la maladie, lorsque l'incertitude du diagnostic a incité le médecin à recourir au laboratoire.

Peut-on alors apporter un diagnostic par l'étude d'un seul sérum, sans la mise en évidence d'une variation significative du titre des anticorps ? On ne peut espérer y parvenir que si l'on connaît

* Dans notre technique, les sérums n'étaient pas testés aux dilutions inférieures à celle du 1/8° ; devant un sérum précoce négatif à cette dilution, nous étions obligés d'admettre que le sérum aurait pu fixer le complément à la dilution 1/4 ; dans ce cas l'exigence d'une variation du titre du simple au quadruple forçait à ne tenir compte, parmi les sérums tardifs, que de ceux atteignant au moins le titre du 1/16.



Graphique III.

d'une part les titres rencontrés dans le sérum de malades, et d'autre part ceux décelés chez un nombre suffisant de sujets considérés comme indemnes d'affection grippale du moins au moment du prélèvement, et vivant le plus possible dans les mêmes conditions et le même pays.

Enfin, les modalités d'extinction des anticorps chez les sujets guéris d'une atteinte grippale récente peuvent conférer une signification aux titres rencontrés chez des sujets suspects de grippe : on peut avancer en effet que si les anticorps disparaissent rapidement du sang circulant après une atteinte par le virus, un titre élevé rencontré chez un sujet suspect de grippe a d'autant moins de raisons d'être considéré comme dû à la persistance d'une immunité antérieure, et d'autant plus de l'être comme significatif d'une infection grippale en évolution.

Si le principe d'une telle méthode de diagnostic s'avérait valable, dans quels délais faudrait-il pratiquer cet unique prélèvement pour que le sujet ait eu le temps de développer des anticorps à ce titre minimum significatif ?

1. Enquête sérologique sur les sérums de sujets sains dits « tout-venant » :

Ces sujets pris comme témoins étaient des étudiants en médecine de l'Ecole du Service de Santé Militaire dont l'âge moyen est de 20 ans et venant, lors de leur entrée dans cet établissement, de toutes les régions de la France.

La répartition des titres rencontrés a été la suivante : total : 187 sujets.

— Grippe à virus du groupe A :

FDC négative au 1/8 : 182, soit 97,16 %.

FDC positive au 1/8 : 4, soit 2,13 %.

FDC positive au 1/16 : 1, soit 0,53 %.

FDC positive au 1/32 : 0.

Ces résultats sont représentés dans le graphique III (barres non hachurées).

— Grippe à virus du groupe B : aucun sérum n'a fixé le complément en présence d'un antigène du groupe B.

2. Modalités d'apparition et d'extinction des anticorps fixant le complément :

La durée éphémère de l'élévation du titre des anticorps fixant le complément confère une signification d'autant plus certaine aux titres rencontrés dans le sérum de sujets atteints de grippe.

Lors de l'épidémie de 1955, nous avons pu suivre un certain nombre de malades d'assez près pour connaître le début clinique de l'affection et suivre l'évolution du titre de leurs anticorps sériques depuis leur apparition jusqu'à leur extinction : pour 114 sujets ont été pratiqués 224 prélèvements ainsi répartis :

Grippe à virus du groupe A :

1	prélèvement :	13	sujets ayant fourni	13	sérums.
2	—	: 63	—	—	126 —
3	—	: 14	—	—	42 —
4	—	: 6	—	—	24 —
Total		: 96			205

Grippe à virus du groupe B :

1	prélèvement :	4	sujets ayant fourni	4	sérums.
2	—	: 2	—	—	4 —
3	—	: 2	—	—	6 —
5	—	: 1	—	—	5 —
Total		: 9			19

Ces résultats sont représentés dans le graphique IV.

3. Le titre significatif :

a) *Définition.*

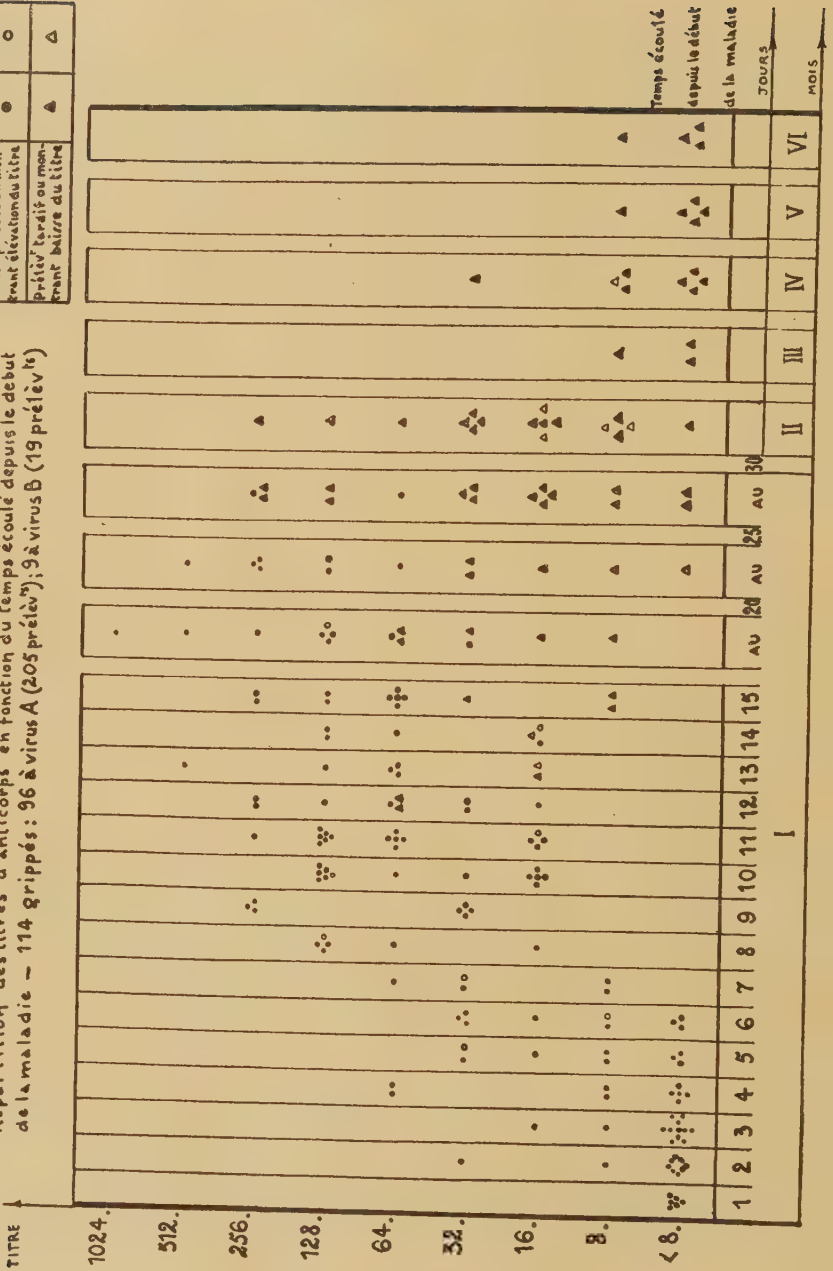
1. - La comparaison sur le même graphique (graphique III) de la répartition des titres d'anticorps chez les malades et chez les « tout-venant », semble montrer que le titre 1/16° est pratiquement toujours significatif d'une infection grippale en évolution, si l'on oppose la rareté de ce titre chez les « tout-venant » (0,53 %) à sa fréquence chez les malades (13,52 %).

2. - La rapidité d'extinction des anticorps fixant le complément vient à l'appui de cette notion : le graphique IV montre, en effet, que le titre maximum, atteint en moyenne du 10° au 20° jour de la maladie, commence dans certains cas à s'abaisser dès le 12° jour et, en général, à la fin du premier mois ; du 4° au 5° mois, un seul des 5 sujets étudiés jusque là titrait encore le 1/8 ; du 5° au 6° mois, un sujet sur 4 titrait encore le 1/8 : on pourrait donc admettre qu'après 6 mois, il ne reste plus dans une collectivité, soumise à une épidémie de grippe, de sujets dont le sérum fixe le complément en présence d'un antigène grippal au delà de la dilution du 1/8.

APPARITION ET EXTINCTION DES ANTICORPS F. C.

Répartition des titres d'anticorps en fonction du temps écoulé depuis le début de la maladie — 114 grippés : 96 à virus A (205 prélevés), 9 à virus B (19 prélevés)

LEGende	Grippe A	Grippe B
Prélev. précoc ou mon. avant élévation du titre	●	○
Prélev. tardif ou mon. avant baisse du titre	▲	△



Graphique IV.

b) Délais d'apparition.

Le même diagramme IV montre la rapidité d'apparition des anticorps fixant le complément :

— au 1 ^{er} jour de la maladie,	tous les sérums sont négatifs au 1/8 ;
— au 2 ^e	— 1 est au 1/32 ; 1 au 1/8 ; 8 négatifs.
— au 3 ^e	— 1 — 1/16 ; 1 — 1/8 ; 11 —
— au 4 ^e	— 2 sont au 1/64 ; 2 — 1/8 ; 11 —
— au 5 ^e	— 2 — 1/32 ; 1 — 1/16, 2 1/8, 5 négatifs.
— au 6 ^e	— 3 — 1/32 ; 1 — 1/16, 2 1/8, 3 —
— au 7 ^e	— 1 est au 1/64 ; 2 — 1/32, 2 1/8, auc. négat.
— A partir du 8 ^e jour,	tous les sérums sont au moins au 1/16°.

Si donc l'on désire pouvoir porter de façon certaine le diagnostic de grippe sur un seul échantillon de sérum par la FDC, *il semble qu'on doive attendre le 8^e jour qui suit l'installation des symptômes pour effectuer le prélèvement*, la FDC pouvant être négative du 2^e au 6^e jour et non significative jusqu'au 7^e. Mais le titre peut parfois être significatif dès le 2^e jour de la maladie.

Il faut noter, de plus, que si un titre au 1/8 n'apporte pas de certitude pour le diagnostic chez un seul individu, *l'apparition de ce titre dans le sérum de plusieurs individus au sein d'une collectivité doit faire soupçonner l'incidence d'une épidémie*, en égard à la rareté de ce titre en période inter-épidémique et à sa fréquence chez les malades dès le 2^e jour de la maladie : Le graphique IV montre, en effet, que du 2^e au 7^e jour de la maladie, 10 sérums sur 62, soit 16 %, atteignent le titre du 1/8 et que 14, soit 22 %, ont atteint ou dépassé le 1/16.

c) Titre significatif de la grippe à virus B.

Le petit nombre de cas de grippe B relevés et l'absence de fixation du complément par les sérums de nos sujets témoins ne permettent pas de tirer de conclusion formelle sur le titre significatif dans cette affection ; toutefois, les quelques sérums de grippés à virus B dont nous disposons semblent se comporter, du point de vue de l'apparition et de l'extinction des anticorps, de la même façon que ceux de grippe A ; il semble donc que le titre du 1/16 soit aussi significatif pour la grippe à virus B.

On peut d'ailleurs tirer argument en faveur de cette opinion de la similitude des courbes de répartition des anticorps anti-A et anti-B chez le cobaye immunisé artificiellement (voir p. 51, graphique II).

C. — INTERET DU TITRE SIGNIFICATIF.

Lors des épidémies de grippe de 1953 et 1955, l'application de la méthode des observations en deux temps nous aurait permis de porter un diagnostic positif dans 120 cas ; encore cette proportion élevée de sujets examinés dans les conditions requises pour la mise en évidence d'une variation du titre des anticorps est-elle due au fait que la plupart de ces malades étaient des militaires que l'on pouvait plus facilement ponctionner plusieurs fois et surtout que bon nombre d'entre eux étaient hospitalisés dans le service des contagieux de l'Hôpital Des Genettes dirigé par le Professeur R. SOMMER, ce qui permettait une liaison satisfaisante avec le laboratoire.

La méthode des observations en un seul temps, en revanche, a permis de faire la preuve de l'étiologie grippale chez 199 sujets, et par conséquent, d'apporter un diagnostic de grippe chez 79 sujets pour lesquels les conditions d'une observation en deux temps n'étaient pas respectées. C'est dire tout l'intérêt du titre significatif.

II. — APPLICATION A DEUX EPIDEMIES

A. — INSUFFISANCE DES SEULES DONNEES CLINIQUES.

Parmi tous les sujets dont nous avons eu à examiner le sérum, nous avons pu obtenir une observation clinique détaillée dans 106 cas, ce qui nous a permis de vérifier l'extrême variété des manifestations cliniques de la grippe authentifiée par le laboratoire, et l'insuffisance des seules données cliniques pour l'établissement du diagnostic étiologique. Nous avons pu classer nos observations en deux grandes catégories :

1. Gripes typiques dont le diagnostic pouvait être posé par les seules données cliniques :

55 cas présentaient les symptômes bien connus de la grippe dans sa forme classique : incubation courte (24 à 48 heures), installation rapide avec fièvre et signes neuro-musculaires, asthénie profonde allant parfois jusqu'à la lipothymie ; installation secondaire des signes rhino-pharyngés et trachéo-broncho-pulmonaires avec congestion et catarrhe des muqueuses provoquant souvent des épistaxis ; évolution courte en 8 jours maximum avec une fièvre souvent diphasique (V grippal), les complications pulmonaires à pyogènes étant habituellement évitées par les antibiotiques.

RAB., 22 ans, venant d'un corps où sévit une épidémie ; début le 26 février par courbature, asthénie, perte de connaissance, puis température, sueurs profuses. Le 28 février, épistaxis au cours d'un lavage de nez ; céphalées frontales ; toux sèche. L'examen montre une rhino-pharyngite ; auscultation et radio normales. Guérison en 5 jours ; la

courbe de température montre un V grippal caractéristique (Graphique V courbe 3). La F.D.C. révèle une forte variation du titre des anticorps ; le lavage permet l'isolement d'une souche de virus du type A'.

LAV., 21 ans, venant du même corps ; début le 18 février au réveil par céphalées, fièvre, courbatures généralisées, mal de gorge ; le soir, frissons et toux ; T° 40 ; scopie normale ; la température redescend jusqu'au 22 fév., pour remonter à 39°4 le 23 (Graphique V courbe 1) ; guérison en 7 jours ; montée d'anticorps significative ; un lavage de nez permet l'isolement d'une souche de virus A'.

Notons toutefois que si ces 55 cas étaient tous suffisamment évocateurs pour ne laisser aucun doute sur la nature grippale de l'affection, 24 d'entre eux seulement présentaient à la fois une courbe thermique diphasique après un début brusque ; 1 eut un début progressif avec V grippal ; 24 présentèrent un début brutal, mais la courbe non diphasique affectait le type d'un clocher aigu revenant à la normale plus ou moins rapidement ; 6 présentèrent un début progressif sans V grippal ; il ne faut donc pas compter dans tous les cas sur le début brusque et encore moins sur une température diphasique dans le tableau clinique typique de la grippe ; même en l'absence de ces signes, le tableau peut être suffisamment évocateur pour qu'on puisse à la rigueur poser le diagnostic sans le secours du laboratoire.

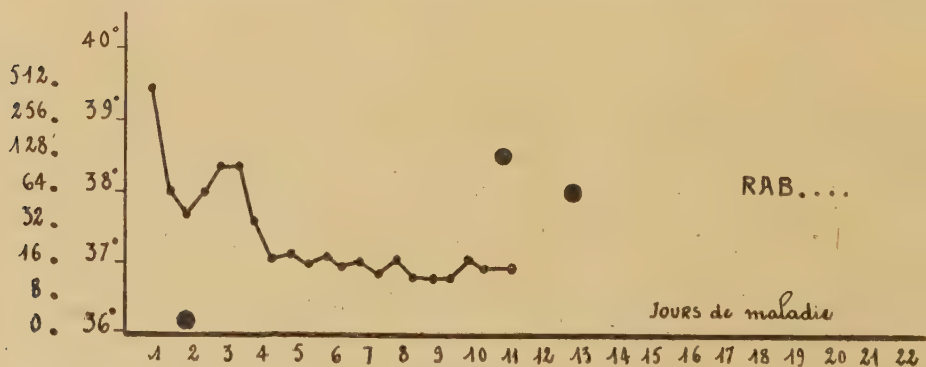
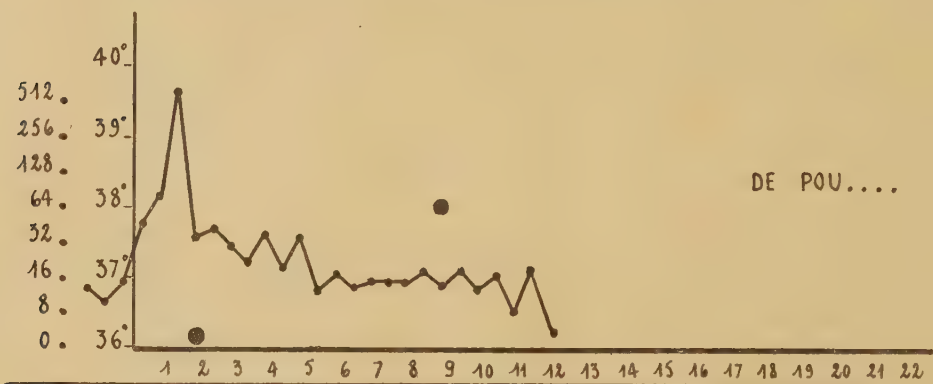
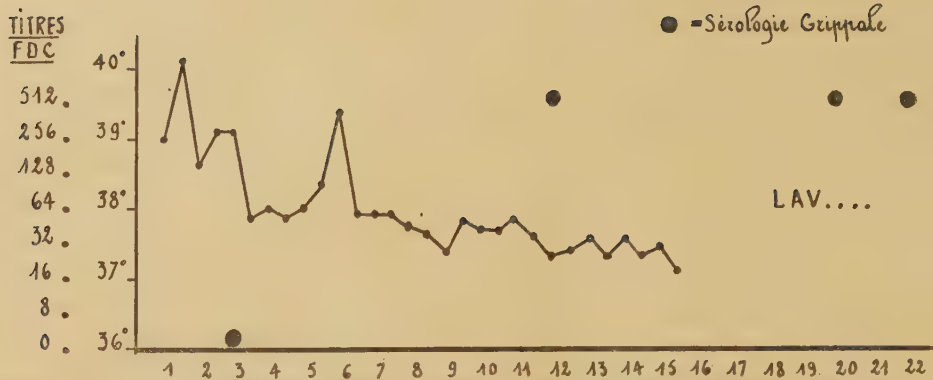
2. Gripes atypiques dont l'allure clinique exigeait une confirmation de laboratoire :

Il n'en est pas de même de 51 sujets qui ont présenté un tableau clinique différent du schéma classique :

a) Gripes protées, évoquant une infection banale :

Dans ce premier lot, nous avons classé 32 sujets ayant présenté un syndrome d'allure frustre, ou dans lequel la prédominance d'un symptôme évoquait, plutôt que la grippe, une infection banale des voies respiratoires ; nous y trouvons : 13 *bronchites fébriles*, 8 cas évoquant le *coryza* par la prédominance de la rhinorrhée, 10 cas évoquant une *angine* banale, enfin 1 cas pour lequel nous donnons le résumé d'observation parce qu'il illustre bien les *formes frustres* que peut affecter l'infection grippale et que, d'autre part, l'affection s'est déroulée dans des conditions quasi expérimentales :

DE POU., appartenant à un corps où on ne signale aucun cas de grippe, est hospitalisé pour cure d'un téniasis découvert lors d'un précédent séjour à l'hôpital ; le 24 au soir, soit 2 jours après son admission, il présente une température à 38° ; le lendemain matin, la T° est à 39°5, pour revenir à la normale le soir même ; pendant ce bref clocher fébrile, le sujet a accusé quelques courbatures sans aucun autre signe objectif ni subjectif ; la réaction de fixation du complément révèle une



Graphique V.

montée d'anticorps significative (Graphique V courbe 2) ; un lavage de nez pratiqué permet d'isoler une souche de virus du type A'.

b) *Grippes évoluant comme une pneumopathie :*

Ce deuxième lot comprend les sujets pour lesquels la scène clinique a été dominée, à un moment de l'évolution, par des signes d'atteinte pulmonaire. On y trouve :

Pneumopathies post-grippales : 2 cas ayant évolué chez deux adolescents en période épidémique :

BARTH., 20 ans, condensation de la base gauche au décours d'un état infectieux fébrile non caractéristique dont l'étiologie grippale est reconnue par la sérologie. Grippe A : 4-2-53 : 1/256 ; 16-2-53 : 1/1024 ; 2-3-53 : 1/128.

DARB., 20 ans, foyer pleuro-pulmonaire de la base droite évoluant vers le pneumothorax spontané, 20 jours après un épisode fébrile d'allure banale, étiqueté par la F.D.C. : Grippe A : 26-1-53 : 0 ; 6-2-53 : 1/32 ; 21-2-53 : 1/64.

Pneumopathies grippales :

Chez 11 sujets, l'infection a évolué d'emblée sous le masque d'une pneumopathie virale ; sur le plan de la réponse biologique, deux groupes doivent être distingués :

— Sujets pour lesquels la sérologie grippale seule fut positive : 9 cas :

3 étaient âgés respectivement de 32, 55 et 62 ans ;

6 étaient de jeunes recrues ;

En outre, 5 de ces cas évoluèrent en milieu épidémique et se révélèrent comme des grippe à virus A' ;

Les 4 autres évoluèrent en dehors d'un foyer épidémique.

1 seul était une grippe A', les 3 autres étaient dus au virus B.

— Sujets pour lesquels plusieurs réactions biologiques furent positives :

MOR., 20 ans, syndrome de pneumonie atypique. Grippe A : 8-2-55 : 0 ; 17-2-55 : 1/128 ; Agglutinines à froid : 17-2-55 : 1/40.

ISA., 21 ans, pleuro-pneumopathie virale ; cuti-réaction négative ; sérologie grippale : 25-4-55 : B : 1/128 ; 4-5-55 : B supérieur à 1/128 ; 17-6-55 : B : 1/16.

Agglutinines à froid : 25-4-55 : 1/40 ; en outre, une sérologie syphilitique, pratiquée au maximum des symptômes, s'est révélée positive ; elle devait se négativer par la suite.

Comment interpréter ces réactions multiples ? Pour STUART-HARRIS (1953), la présence d'agglutinines à froid au cours d'une

pneumopathie grippale serait sous la dépendance d'une réactivation de virus de la P.A.P. par le virus grippal. En réalité, il faut avouer que la présence d'agglutinines à froid n'est pas pathognomonique d'un virus déterminé (CATEIGNE, 1950 a - BOUCHER, 1951 - SOHIER 1954 b), non plus qu'une sérologie syphilitique positive, et qu'elles peuvent se rencontrer au cours des pneumopathies grippales et de l'ornithose-psittacose.

c) Gripes évoquant d'autres affections :

Nous avons classé dans un troisième lot 6 cas dont le diagnostic clinique posait des problèmes particulièrement ardu, soit par l'allure clinique, soit par les circonstances d'apparition, soit enfin par l'évolution :

Grippe avec signes méningés :

CHAR., 18 ans, venant de Grenoble, est hospitalisé le 7-3-55 pour syndrome méningé évoluant depuis 48 heures avec céphalées, coryza, raideur de la nuque ayant débuté par un frisson, asthénie, T° à 39 ; l'examen note une raideur de la colonne cervicale, Kernig douteux, pas de Brudzinski, réflexes normaux ; ce syndrome méningé provoque les investigations biologiques habituelles. L'absence de modifications du L.C.R., un examen ophtalmologique normal, une vitesse de sédimentation peu élevée, une coproculture négative, l'évolution résolutive avec courbe thermique diphasique montrent qu'il s'agit d'une forme atypique de grippe, que la fixation du complément vient confirmer : 8-3-55 : A = 0, B = 0 ; 15-3-55 : A = 0, B = 1/128. L'isolement du virus tenté à partir du L.C.R. échoue.

Hépatite épidémique et grippe :

COM., venant de Sathonay où il est serveur au foyer, a déjà été hospitalisé dans le service pour hépatite ictérogène du 23-12-52 au 16-1-53 ; en convalescence, il présente, à partir du 11-2-53, un épisode infectieux fébrile avec céphalées, catarrhe oculo-nasal, et toux, qui persiste jusqu'au 16-2-53, où les urines foncées, le selles décolorées, le prurit, font craindre une rechute de l'ictère ; l'évolution résolutive, la sérologie grippale montrent qu'il s'agit d'une grippe authentique : 14-2-53 : A = 0 ; 27-2-53 : A = 1/256.

FILOU., remplissant les mêmes fonctions dans la même unité, présente à partir du 13-1-53 une hépatite ictérogène vraisemblablement contractée au contact de COM., et dont le début (7-1-53), marqué par un épisode fébrile d'allure banale, n'aurait pu être ramené à sa véritable cause si la sérologie grippale n'avait révélé une montée d'anticorps significative : 30-1-53 : A = 0 ; 4-2-53 : 1/32.

Grippe après vaccination :

RIMB., observation résumée dans le graphique VI.

Tuberculose succédant à la grippe : anergie post-grippale.

MAN., jeune soldat venant de Lyon, est hospitalisé dans le service du Médecin-Commandant Boucher en janvier 1953 (période épidémique) pour fatigue brutale, température à 38 et douleur scapulaire ayant débuté le 16-1-53 ; rapidement apparaissent dyspnée, point de côté, épanchement à la scopie ; la V.S. devient élevée ; l'affection évolue vers une polysérosite bacillaire. La notion d'épidémie et l'évolution du titre des anticorps fixant le complément suggèrent qu'il s'agit d'une tuberculose au décours d'une grippe atypique à virus B : sérologie : 19-1-53 : B = 1/32 ; 26-1-53 : B = 1/16 ; 3-2-53 : B = 0.

LEB., 21 ans, venant de Sathonay, est hospitalisé dans le service du Ct Boucher pour un état pseudo-typhique sévère datant du 1-3-55 ; la cuti-réaction pratiquée à l'incorporation était positive ; cet état évolue vers la guérison, mais avec asthénie consécutive intense ; la sérologie pratiquée montre qu'il s'agit d'une grippe authentique à virus du groupe A : 17-3-55 : A = 1/128 ; 6-4-55 : A = 1/32 ; 24-6-55 : A = 0. Le 28-5-55 se constitue une pleurésie séro-fibrineuse gauche.

B. — VALEUR DIAGNOSTIQUE DE LA REACTION.

1. Sensibilité :

Pour 106 sujets dont nous avons pu examiner le détail de l'observation clinique et l'allure de la courbe thermique, 55 présenteront un tableau clinique qui permettait de poser le diagnostic sans le secours d'investigations biologiques. Chez 51 malades par contre, si l'étiologie grippale aurait pu, dans certains cas, être évoquée, la preuve n'a été apportée que par le secours de la réaction de FDC, ce qui représente un gain considérable par rapport aux seuls éléments cliniques de diagnostic ; encore avions-nous limité ces investigations aux seuls sujets chez lesquels l'infection eut une traduction clinique, sans pouvoir, pour des raisons matérielles, rechercher l'incidence des formes inapparentes.

Existe-t-il des *réactions faussement négatives* ? Chez 45 sujets pour lesquels la FDC a fait rejeter l'étiologie grippale, nous pouvons distinguer :

a) 29 sujets chez lesquels l'allure clinique ne plaidait guère en faveur de cette étiologie : 1 embarras gastrique fébrile, 11 angines, 4 bronchites banales, 2 coryzas, 8 états fébriles frustes, 3 pneumonies atypiques relevant d'une autre étiologie.

b) 12 sujets pour lesquels l'allure clinique, non convaincante, aurait pu cependant relever du virus grippal, et chez qui la FDC n'a pu révéler que la présence d'anticorps à un titre du 1/8, donc inférieur au titre du 1/16 admis comme significatif, soit que nous n'ayons pu pratiquer la réaction que sur un échantillon précoce, soit que les deux prélèvements aient montré le même titre du 1/8,

soit enfin qu'un échantillon ait donné une réponse négative, un autre atteignant le 1/8 ; or, ces sujets présentèrent leur affection en période épidémique : nous croyons pouvoir rappeler à leur propos la remarque que nous faisons au début de ce chapitre (délai d'apparition du titre significatif). Eu égard à la rareté du titre du 1/8 en période inter-épidémique, la fréquence accrue de ce titre en période d'épidémie laisse penser qu'un certain nombre de sujets fournissent à l'agression virale une réponse aussi faible sur le plan sérologique que sur le plan clinique, ou bien même que cette réponse est strictement sérologique, le trouble clinique ne relevant pas du virus grippal ; celui-ci se bornerait alors à provoquer un léger rappel des anticorps engendrés par une atteinte antérieure, l'affection actuelle, non spécifique, n'étant pour nous qu'une occasion de constater ce rappel.

c) Chez 4 sujets, par contre, le début brusque, les symptômes évocateurs, une courbe thermique diphasique, ne laissent pas de doute sur la nature grippale de l'affection :

— Pour l'un, le sérum était anticomplémentaire ;

— Deux n'ont fourni qu'un prélèvement précoce de sérum, à l'exclusion de tout prélèvement tardif qui aurait pu mettre en évidence une montée d'anticorps.

— Le quatrième, enfin, nous a paru constituer un cas authentique de défaillance de la réaction :

CHA..., venant d'une unité cantonnée à Lyon, en période épidémique, est hospitalisé le 21 février 1955 pour un état fébrile ayant débuté le 19, par frissons, courbatures lombaires et rachialgies, céphalées, et constitué à la période d'état de température à 39, céphalées frontales, asthénie intense, toux, facies congestif et langue saburrale ; ce tableau et l'évolution diphasique de la courbe thermique font porter le diagnostic de grippe : la réaction de fixation du complément pratiquée sur deux échantillons prélevés au 3^e et au 11^e jours de la maladie répond : 21-2-55 : A : 0 ; B : 0 ; 1-3-55 : A : 1/8, B : 0, mettant en évidence une montée non significative. Peut-être un prélèvement plus tardif aurait-il pu révéler une réponse sérologique anormalement décalée par rapport à la clinique.

STUART-HARRIS (1953) conclut, à propos de ces réactions fausement négatives, que si leur existence n'est pas contestable (isolement du virus positif chez certains sujets ne présentant pas de montée d'anticorps), cette éventualité est rare et que plusieurs explications peuvent être envisagées :

— La plus évidente est qu'il ne s'agisse pas d'une grippe.

— S'il s'agit manifestement d'une grippe, la défaillance de la réaction peut s'expliquer par le fait que la réponse sérologique à l'infection est parfois hautement spécifique et, peut-être, ne peut se révéler que si la souche responsable de l'infection est utilisée comme antigène ; en effet, plus on utilise d'antigènes dans les

tests, plus on enregistre de résultats positifs ; l'emploi de l'antigène « soluble » dans la réaction réduit d'ailleurs cette difficulté au minimum.

2. Spécificité : Réactions faussement positives :

Il paraît à priori très difficile d'affirmer leur existence si l'on tient compte de l'allure clinique éminemment variable de la grippe ; mais on peut se demander si des affections connues et différentes de la grippe, en particulier d'autres viroses, ne pourraient pas donner lieu à une élévation du titre des anticorps non significative d'une infection par le virus grippal : cette éventualité est, à priori, peu probable si l'on se souvient que les antigènes utilisés dans la réaction sont préparés à partir du virus lui-même ; ce fait permet d'attendre d'une telle réaction une spécificité comparable à celle de la réaction de NELSON pour le diagnostic de l'infection syphilitique ; de fait, la pratique journalière de la réaction de fixation du complément appliquée au diagnostic des infections à virus nous a convaincu de la rareté de ces fausses réactions positives : Ainsi nous avons pu vérifier l'absence de réactions positives dans les sérums, pour 4 cas de rubéole, 1 cas de rougeole, 4 cas d'oreillons (dont un porteur d'une méningite à liquide clair), 1 cas de leucémie et 6 cas d'ornithose confirmée par le laboratoire.

Un cas, cependant, a particulièrement attiré notre attention :

DELP... Victor, 22 ans, soldat au camp de La Valbonne, hospitalisé dans le service de médecine du Médecin-Colonel Camelin, présente le 9-5-55, toux, céphalées, lombalgies, rhino-pharyngite, signes de bronchite, température à 39, vitesse de sédimentation normale.

La radiographie montre une ombre diffuse peu dense, parahilaire gauche, qui fait porter le diagnostic de pneumonie atypique. Ces signes évoluent vers la résolution et le malade quitte le service le 9-6-55. Revu le 7-7-55, il ne présente aucune séquelle.

La réaction de fixation du complément pratiquée avec un antigène d'ornithose et les deux antigènes grippaux a donné les résultats suivants :

— Sérum du 23-5-55 : ornithose : 1/256 ; grippe A : négatif ; B : 1/32 ;
— Sérum du 6-6-55 : — : 1/128 ; — : non pratiquée.

Chez ce sujet dont les réactions en présence de l'antigène d'ornithose étaient très fortement positives (voir PEILLARD, SOHIER, GINESTE, 1955), le diagnostic d'ornithose ne faisait aucun doute. La réaction positive à un titre significatif en présence de l'antigène B semblait constituer un exemple de l'absence de spécificité de la réaction lorsque l'enquête épidémiologique révéla que, dans la même unité, deux autres cas de grippe B d'allure sporadique avaient évolué à la suite de celui-ci (le premier eut une pneumonie atypique le 23-5-55 pour laquelle il fut hospitalisé, et étiquetée grippe B par la réaction de fixation du complément, le deuxième est RIMB.

dont nous avons présenté l'observation p. 65). Il n'est donc pas interdit d'évoquer pour ce sujet, plutôt qu'une erreur par excès de la réaction ou un rappel d'anticorps non spécifique par l'infection ornithosique, une authentique infection double. Nous en avons d'autant plus déploré que la faible quantité de sérum fournie lors du deuxième prélèvement n'ait pas permis de pratiquer la réaction en présence de l'antigène grippal. On peut également tirer argument en faveur de l'absence de réactions croisées entre la grippe et d'autres affections à virus, de l'expérimentation effectuée chez l'animal.

Un cobaye a été infecté expérimentalement par inoculation simultanée du virus des oreillons et celui de la grippe (voie nasale : oreillons : souche BOS ; grippe : souche LEE environ 0,7 ml.). On a assisté alors à l'élévation parallèle des titres des anticorps spécifiques pour chaque type de virus, puis à leur retour à une valeur voisine de zéro ; on a alors pratiqué une réinoculation par le virus ourlien et constaté que le rappel du titre des anticorps anti-ourliens n'entraînait aucune modification du titre des anticorps anti-grippaux qui restait égal à zéro. Voici le protocole de l'expérience :

Jours de l'expérience	1	12	30	44	52	64	75	92	176	383	396	403
Titre des anticorps anti-ourliens ...	0	128	32	—	—	16	8	0	—	0	2048	—
Titre des anticorps anti-grippaux ...	0	—	—	8	512	—	512	256	256	0	0	0

Le cobaye a reçu : du virus ourlien au 1^{er} et au 383^e jour.
: du virus grippal au 1^{er} et au 44^e jour.

En ce qui concerne la *spécificité de la réaction vis-à-vis des souches*, le problème se pose différemment ; nous avons vu que, s'il est possible d'utiliser dans les réactions des antigènes viraux dont la spécificité étroite est comparable à celle des hémagglutinines, en pratique on utilise, pour le diagnostic clinique, les antigènes solubles, fraction commune à toutes les souches du même groupe. Leur impuissance à distinguer entre les souches, peu importante aux yeux du clinicien qui ne demande au laboratoire que la confirmation ou l'élimination d'un diagnostic, tourne à son avantage quand on ignore à quelle variété de virus on a affaire, la mise en œuvre de la réaction avec deux antigènes du type A et du type B permettant de déceler la quasi-totalité des infections grippales.

Cette incapacité de la réaction de fixation du complément à distinguer entre les souches d'un même type de virus nous amène à aborder un autre problème qui a retenu notre attention : celui des *positivités mixtes*.

Dans quelques rares cas, la réaction pratiquée sur le sérum d'un sujet présentant les manifestations cliniques de la grippe, se révèle positive simultanément en présence des deux antigènes A et B. Nous avons noté le phénomène chez 7 de nos malades :

			FDC grippe A	FDC grippe B
— MAR., épidémie Valence, 1953.	15-1-53 :		0	0
	22-1-53 :		1/64	1/16
— VER., — Sathonay, 1955.	16-2-55 :		1/128	1/16
	1-4-55 :		1/64	1/8
	9-6-55 :		1/32	1/8
— PER., — Ambérieu, 1955.	20-5-55 :		1/16	1/8
— GUI., — La Valbonne, 1955.	30-3-55 :		1/64	0
	24-6-55 :		1/8	1/8
— MOR., — Lyon, 1955.	8-2-55 :		0	1/8
	17-2-55 :		1/128	1/8
— CAS., — Lyon, 1955.	22-2-55 :		1/256	1/32
	5-3-55 :		1/128	1/32
— CHE., — Lyon, 1955.	15-4-55 :		1/8	1/256
	25-4-55 :		1/8	1/256

Chez 6 sujets, on note une forte positivité pour l'antigène A contrastant avec une faible positivité pour l'antigène B, qui nous a fait porter le diagnostic de grippe à virus du groupe A ; chez un seul sujet où la réaction était fortement positive vis-à-vis de l'antigène B, nous avons conclu à une grippe à virus du groupe B.

Le phénomène pourrait, semble-t-il, recevoir plusieurs interprétations :

1. — On pourrait admettre chez un même sujet l'infection simultanée par les deux types de virus ; la preuve ne peut en être apportée de façon formelle que par l'isolement des deux souches ; le fait aurait été constaté mais ne l'avons pas vérifié chez nos 7 malades.

2. — Il est permis d'invoquer l'existence, dans le sérum de ces sujets, de co-sensibilisatrices fixant le complément en présence de l'antigène différent de celui qui a déterminé l'infection, de même que, parmi les infections à germes figurés il existe des co-agglutinines pour des micro-organismes du même genre (leptospiroses), voire de genres très différents (salmonella et Rickettsia - Brucella suis, Pasteurella tularensis et Vibrio comma).

Il faut alors supposer que le virus infectant possède une fraction commune avec l'antigène qui donne la réponse non spécifique : mais on peut retourner l'argument et admettre que, le sujet ne possédant qu'un type d'anticorps, ce sont les antigènes qui servent à nos réactions qui sont insuffisamment purifiés.

3. — On peut également envisager que l'infection par un type de virus entraîne le réveil d'une immunité antérieure et jusque-là latente pour un virus d'un autre type ; l'infection par le virus d'un type nouveau provoquerait le rappel des anticorps pour le virus antérieurement rencontré, soit par un phénomène non spécifique, soit parce que le dernier virus rencontré possède une fraction antigénique commune avec le premier.

4. — L'hypothèse est valable enfin de deux agressions par les deux types de virus, séparées dans le temps par un intervalle tel que les anticorps engendrés par la première n'ont pas complètement disparu au moment où survient la seconde. Le cas Mor... nous semble en particulier relever de ce mécanisme puisque la réaction est déjà positive au 1/8 pour l'antigène B, alors qu'elle est encore négative pour l'antigène A, sur le sérum prélevé au début de l'affection.

INTERET EPIDEMIOLOGIQUE DE LA REACTION

La méthode de fixation du complément permet-elle, par l'échantillonnage pratiqué sur les sérums des sujets d'une collectivité, de tirer des conclusions valables sur la nature grippale d'une infection régnant sur cette collectivité ?

A priori oui :

— Du fait que les réactions sont positives au-dessus d'un certain taux seulement chez les sujets grippés ;

— Du fait du caractère éphémère de l'élévation du titre des anticorps engendrés.

Au cours des manifestations de la grippe qui ont sévi dans la région lyonnaise de 1953 à 1955, la pratique systématique de la réaction de fixation du complément suivant les techniques précédemment exposées nous a permis de vérifier l'exactitude d'un certain nombre de caractéristiques avancées par les auteurs au sujet de l'épidémiologie de la grippe.

I. — DEROULEMENT CHRONOLOGIQUE DES EPIDEMIES.

En 1953 :

Une première poussée épidémique a sévi, du 9 au 20 janvier, dans deux unités militaires stationnées à Valence-sur-Rhône ; elle a donné 147 cas en 10 jours et s'est éteinte rapidement sans avoir comporté aucun cas grave ; sur ce nombre de cas cliniques, la FDC a permis 22 confirmations sérologiques.

Une deuxième poussée a éclaté à partir du 19 janvier dans un camp militaire à Sathonay. Elle a comporté 144 cas sans forme sévère et s'est éteinte en deux semaines : 12 cas ont comporté une sérologie confirmative.

Un troisième groupe comprenait des sujets de Lyon ou des environs immédiats, pour la plupart hospitalisés à l'Hôpital Militaire Des Genettes, ou appartenant à des collectivités militaires stationnées en divers points de Lyon : en raison de cette dispersion, on ne peut préciser l'ampleur exacte de la morbidité dans ce groupe qui est hétérogène, contrairement aux précédents, mais 82 sujets ont présenté une réaction positive, dont une du groupe B.

Sauf pour ce dernier cas, dans ces trois groupes de malades la réaction s'est montrée positive uniquement avec un antigène du groupe A. La réaction d'inhibition de l'hémagglutination mise en œuvre avec des sérums provenant de chacun des trois groupes a été positive pour le virus du type A' (FM 1) ; de plus, une souche a été isolée, dont l'identification, commencée au laboratoire et complétée au Centre Mondial de la Grippe à Londres a confirmé qu'il s'agissait d'un virus du groupe A' (FM1), sous-type Scandinavica.

En 1954 :

Nous n'avons assisté à aucune manifestation de la grippe dans la région lyonnaise et nous avons tout lieu de penser qu'elle a effectivement été absente pendant toute cette période ; en effet, nous n'avons reçu, en un an, que 13 demandes de sérologies grippales pour des sujets suspects, dont un seul présenta une fixation faible, à un titre non significatif.

En 1955 :

Contrairement aux poussées de 1953 qui ont affecté un mode épidémique caractérisé, les manifestations de la grippe en 1955 ont été plus localisées, affectant plutôt le mode inter-pandémique, voire une allure sporadique dans certains cas. Chronologiquement, la marche du virus fut la suivante :

1. - Une vingtaine de sujets présentèrent des manifestations grippales dans une unité militaire de VÉNISSIEUX, du 31 janvier au 25 mars ; 4 cas furent confirmés par un examen sérologique positif en présence d'un antigène du groupe A.

2. - Parallèlement, 17 cas étaient relevés dans une caserne de LYON (Fort-Lamothé), dont 4 gripes du groupe A confirmées, entre le 31 janvier et le 2 mars.

3. - Puis 31 cas étaient relevés dans le camp militaire de ΣΑΤΗΘΝΑΥ, du 1^{er} février au 31 mars, parmi lesquels 12 sujets montrèrent une réaction positive pour le virus A et 1 pour le virus B.

4. - Dans un autre camp militaire situé à 30 km. de LYON, à LA VALBONNE, 86 sujets payèrent le tribut à la grippe entre le 27 février et le 31 mars : 8 sérologies positives avec le groupe A permirent d'étiqueter ces manifestations.

5. - Un cas, confirmé par la sérologie était relevé dans la caserne lyonnaise de LA PART-DIEU le 19 mars.

6. - De plus, l'Hôpital Militaire DES GENETTES admit dans ses services à partir du mois de février, outre les malades des corps cités dont l'état justifiait cette mesure, deux catégories de malades suspects de grippe :

a) *La première* comportait des sujets de la région lyonnaise ou de LYON-même parmi lesquels on relève :

- 13 gripes A' confirmées et 1 grippe B confirmée, contemporaines des cas sévissant dans les collectivités précédentes ;
- En outre, une grippe à virus du groupe A et 9 gripes à virus B furent hospitalisées à une époque où les diverses flambées de la région étaient éteintes, le cas le plus tardif étant survenu le 13 juillet.

b) *La deuxième* comportait des sujets évacués sur cet hôpital, de régions plus éloignées :

- 5 gripes à virus du groupe A et 2 gripes à virus B provenant d'une collectivité militaire de GRENOBLE, survenus en février et mars ;
- 1 grippe B évacuée de BOURG-SAINT-MAURICE (Savoie) le 25 avril ;
- 1 grippe B provenant de TOUL (Meurthe-et-Moselle) le 12 avril.

7. - Enfin, en mai et juin furent hospitalisés 3 sujets venant de LA VALBONNE, dont le sérum révéla des titres d'anticorps significatifs pour l'antigène du groupe B.

De tous ces cas furent isolées trois souches de virus qui, après mise en œuvre de méthodes complémentaires et confirmation par le Centre Mondial de LONDRES, se révélèrent, comme la souche isolée en 1953, du type A prime (FM1), sous-type Scandinavica.

II. — APPORT DE LA REACTION A UNE ETUDE EPIDEMIOLOGIQUE.

L'étude épidémiologique des cas de grippe ayant éclaté en 1953 et 1955 dans des collectivités militaires homogènes nous a permis de vérifier la réalité des caractéristiques de la propagation de l'infection grippale et la variabilité de ses manifestations.

La façon dont l'enquête fut menée dans ces collectivités appelle quelques remarques : Chaque fois qu'un médecin d'unité signalait l'incidence probable de la grippe dans l'infirmierie dont il avait la charge, il lui fut demandé de fournir, pour la période intéressée, le relevé sur le registre d'infirmierie du nombre de malades consultants pour affection des voies respiratoires supérieures. Mais l'étude des courbes de morbidité se montra d'analyse assez complexe pour les raisons suivantes :

Si, pour certaines des unités, les consultants étaient admis à l'infirmierie de cette même unité, l'étude du nombre de consultants de cette infirmierie reflétant fidèlement la morbidité de l'unité, elle était moins significative dans des infirmieries qui drainaient les malades de plusieurs unités. Ainsi, en 1955, des malades appartenant à une collectivité de VÉNISSIEUX furent successivement envoyés en consultation à la caserne du FORT-LAMOTHE, où existait un service médical de place, puis évacués sur le camp de SATHONAY qui fonctionnait comme infirmierie de garnison. Les médecins de ces formations nous transmirent, bien entendu, le relevé complet de tous les malades examinés par eux : les courbes de morbidité dont nous disposions dans ce cas n'étaient pas pures et il fallut reprendre le détail de ces relevés de façon à rapporter à leur véritable origine tous les cas qu'ils comprenaient ; cette nécessité, qui compliquait la tâche de l'épidémiologiste, nous ménagea des surprises fructueuses sur la marche de l'infection grippale dans les unités : le détail des tribulations des malades ayant passé par plusieurs infirmieries est indiqué dans le tableau suivant, où le numéro d'ordre des sujets correspond à celui porté sur les diagrammes I (courbe 2), II et III.

N°	NOM	CORPS D'ORIGINE	CONSULTATION FORT-LAMOTHE	EVACUATION SATHONAY	SYMBOLE DU CORPS
1	LIB.,	La Valbonne	—	—	—
2	SER.,	id.	—	—	—
3	MAH.,	id.	—	—	—
4	GUL.,	id.	—	—	—
5	RUE.,	id.	—	—	—
6	POM.,	id.	—	—	—
7	BAR.,	id.	—	—	—
8	MAL.,	id.	—	—	—
9	PER.,	Vénissieux	+	+	cercle
10	JOU.,	id.	+	+	id.
11	CHA.,	id.	+	+	id.
12	DUP.,	id.	+	+	id.
13	BAL.,	La Part-Dieu	+	—	triangle
14	ROC.,	Fort-Lamothe	+	—	carré
15	CLE.,	id.	+	+	id.
16	PER.,	id.	+	—	id.
17	BLA.,	id.	+	+	id.
18	VER.,	Sathonay	—	—	—
19	NOC.,	id.	—	—	—
20	DAR.,	id.	—	—	—
21	DRI.,	id.	—	—	—
22	GUY.,	id.	—	—	—
23	LES.,	id.	—	—	—
24	BLE.,	id.	—	—	—
25	FOU.,	id.	—	—	—
26	LAV.,	id.	—	—	—
27	RAB.,	id.	—	—	—
28	MAI.,	id.	—	—	—
29	JAN.,	id.	—	—	—

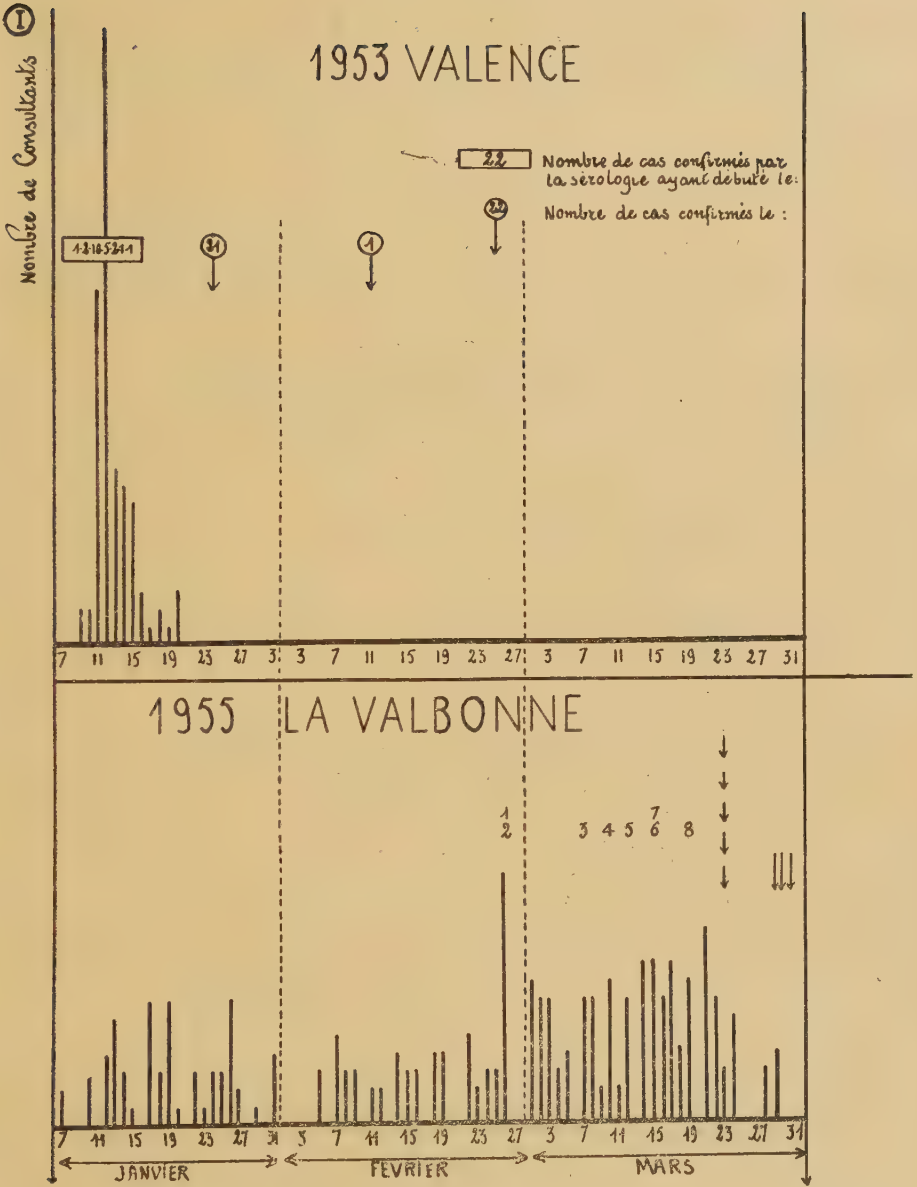


Diagramme 1.

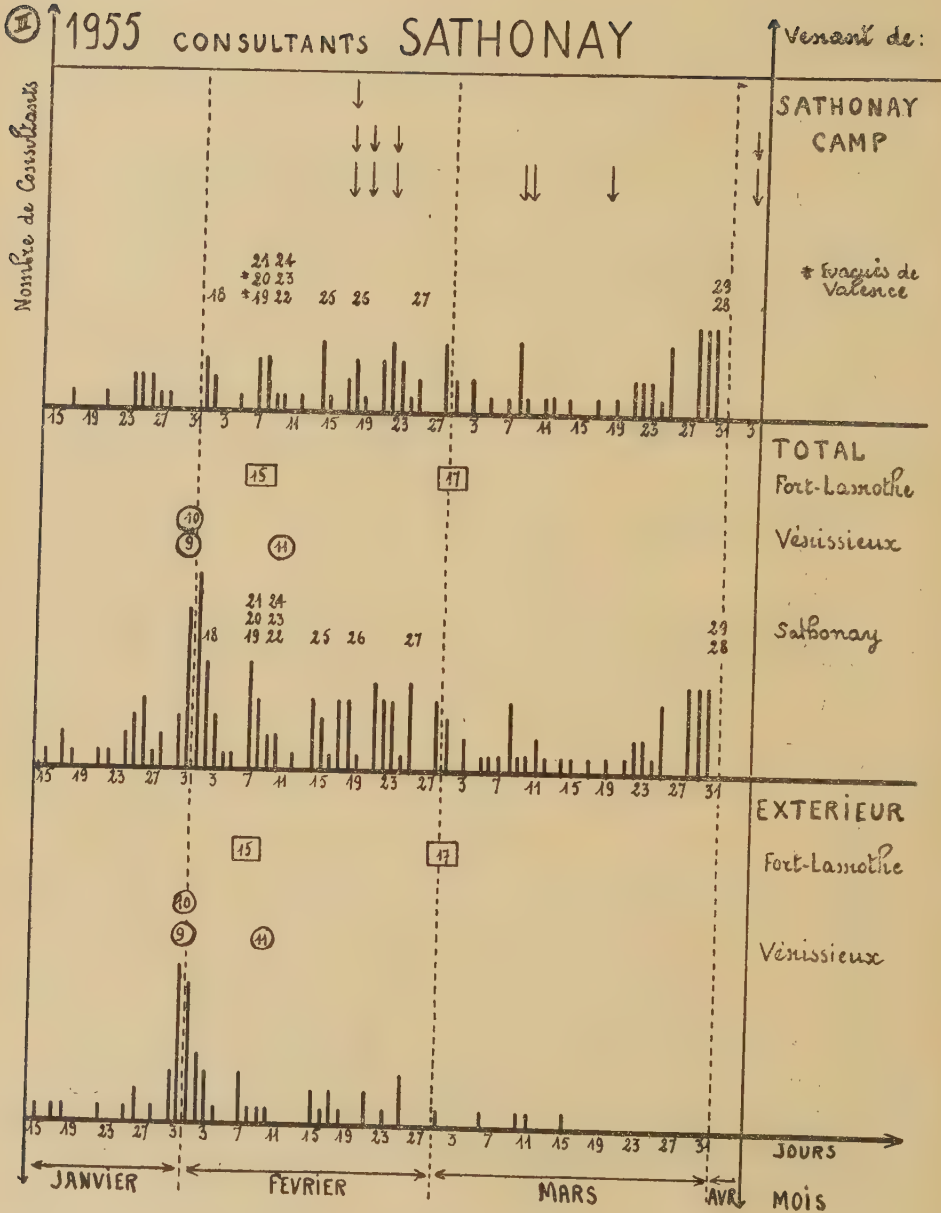


Diagramme 2.

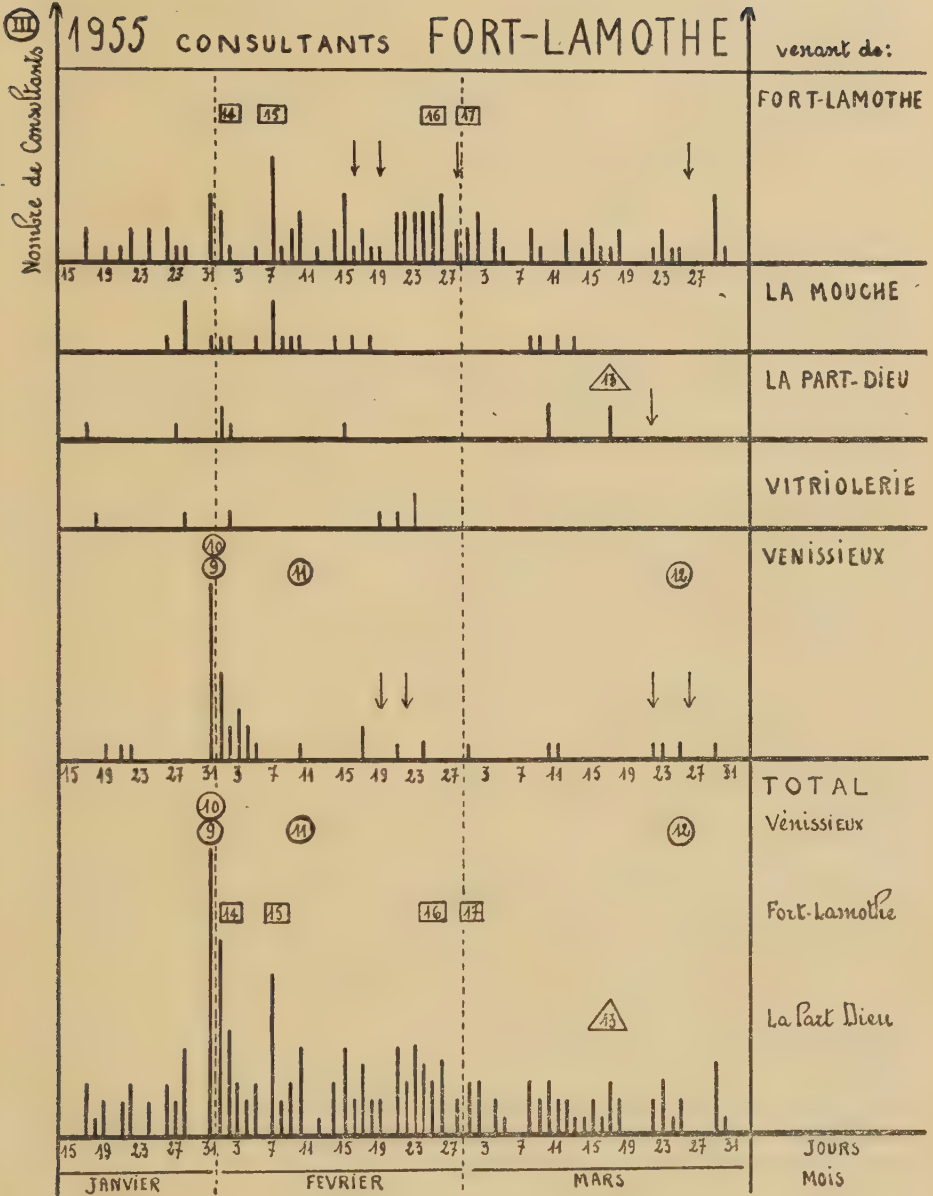


Diagramme 3.

**A. - Renseignements fournis par l'étude des courbes de morbidité :
Intérêt de la réaction de fixation du complément.**

1. - Réalité du clocher de morbidité dans certaines épidémies.

Le simple examen de la courbe exprimant le nombre des consultants à l'infirmierie de VALENCE lors de l'épidémie de 1953 (diagramme I, courbe 1) confirme l'allure explosive mais spontanément résolutive de la grippe dans cette unité. La réaction de fixation du complément n'a fait qu'apporter une confirmation de laboratoire à l'étiologie de cette flambée de morbidité, évidente par les seules données épidémiologiques.

La courbe de morbidité de LA VALBONNE en 1955 (diagramme I, courbe 2), si elle montre également un clocher d'apparition assez brusque le 26 février, semble traduire que la grippe ne s'y est pas manifestée avec un caractère très explosif puisque le clocher initial est beaucoup plus discret et que, d'autre part, l'augmentation de la morbidité s'étale sur un mois montrant que l'épidémie fut lente à s'éteindre. Dans un tel exemple, la confirmation par le laboratoire fut d'un grand secours pour étiqueter cette courbe qui aurait pu tout aussi bien traduire l'incidence du coryza ou d'une épidémie d'angines ; si la clinique faisait soupçonner le virus grippal pour certains sujets, seul le laboratoire permit d'étiqueter ce clocher.

2. - Grippe évoluant dans une collectivité sans répercussion sur la courbe de morbidité.

L'examen initial des courbes de morbidité des infirmieries de SATHONAY et du FORT-LAMOTHE aurait pu faire conclure que, comme à LA VALBONNE, la grippe y évoluait sur un mode épidémique bâtarde, traduit par un clocher initial modeste que les examens de laboratoire permettaient de rapporter à l'infection grippale (diagramme II, 2^e courbe, diagramme III, 6^e courbe), mais l'analyse de ces deux courbes montre que :

Le clocher retrouvé du 31 janvier au 2 février sur la courbe de SATHONAY (considéré comme infirmierie de garnison, II, 2) appartient en réalité aux malades venant surtout du FORT-LAMOTHE et de VÉNISSIEUX (II, 3), la courbe des malades du camp de SATHONAY lui-même ne montrant guère d'augmentation de la morbidité, bien qu'à partir du 1^{er} février, des cas de grippe authentiques confirmés par la sérologie aient évolué dans cette unité (II, 1).

Ce même clocher, rapporté aux consultants de FORT-LAMOTHE (considéré comme infirmierie de Place (III, 6), n'est pas dû non plus aux malades de la caserne du FORT-LAMOTHE (III, 1), mais bien uniquement aux consultants provenant de VÉNISSIEUX dont la courbe montre également ce même clocher le 31 janvier (III, 5). La courbe

des malades en provenance du FORT-LAMOTHE lui-même (III, 1) traduit de façon extrêmement discrète sinon nulle, que 4 cas de grippe authentiques confirmés par la sérologie y ont évolué du 1^{er} février au 1^{er} mars.

Ainsi, en 1955, la grippe a donné lieu à une augmentation de la morbidité uniquement à LA VALBONNE et à VÉNISSIEUX ; partout ailleurs elle a donné lieu à des cas authentiques, mais sans répercussion sur la morbidité générale : si les médecins du FORT-LAMOTHE et de VÉNISSIEUX nous avaient transmis le relevé des seules affections qui sévissaient dans leurs unités, la courbe de morbidité de ces unités n'aurait pas permis de soupçonner que la grippe était en train d'y évoluer.

B. - Bilan des épidémies et essai d'interprétation.

L'étude des manifestations de la grippe dans la région lyonnaise de 1953 à 1955 nous a permis de vérifier un certain nombre de notions considérées comme caractéristiques de cette infection :

— Pour un cas, elle a mis en évidence le rôle possible d'une vaccination comme facteur provoquant dans le déclenchement d'une grippe (voir p. 65).

— Pour deux cas, elle a illustré les rapports de la grippe et de la tuberculose (voir p. 66).

— En outre, elle a révélé que, pendant les épidémies, un nombre insolite de sujets possèdent dans leur sérum des titres d'anticorps au 1/8.

— Surtout, elle oppose de façon saisissante la grippe de 1953 à celle de 1955 :

En 1953, la grippe a frappé un plus grand nombre de sujets, n'épargnant pas plus les militaires que la population civile. Elle s'est déclarée et propagée suivant un mode explosif mais s'est éteinte rapidement. Elle a donc affecté le *mode épidémique vrai*.

Enfin, elle a été provoquée par une seule souche de virus (un seul cas de grippe B sporadique).

En 1955, à l'inverse, elle a affecté un nombre plus restreint de sujets, évoluant par petits foyers dans des collectivités militaires ; elle n'a pas, à notre connaissance, affecté la population civile. Lente à se déclarer, elle a été également lente à s'éteindre. Elle a comporté un certain nombre de cas d'allure sporadique. Elle a donc affecté le mode endémo-épidémique ou sporadique.

Surtout, le fait nouveau de l'année 1955 a été l'incidence, à côté de la grippe à virus A, de cas de grippe à virus B. Si la plupart de ces derniers ont concerné des cas isolés (on sait que la grippe à virus B donne souvent lieu à des cas sporadiques), en deux occasions (GRENOBLE : 2 cas ; LA VALBONNE : 3 cas), leur groupement suggère que la grippe B a pu évoluer en foyer. Il est remarquable

d'autre part, que 10 de ces grippez B ont dû être hospitalisées dans le service de pneumologie de l'Hôpital Des Genettes (Médecin-commandant BOUCHER).

Or, le typage des souches isolées en 1953 et en 1955 a montré qu'elles étaient identiques. Il ne faut donc pas chercher dans le virus la cause de la différence entre les deux épidémies. On peut, par contre, supposer que l'épidémie de 1953, en créant une immunité relative dans la population, n'a permis au même virus, survenant en 1955, que de déterminer des manifestations atténuées.

Au contraire, l'absence de grippe à virus B en 1953 expliquerait que, survenant en 1955, elle ait déterminé un pourcentage important de formes pulmonaires.

INTERET IMMUNOLOGIQUE DE LA REACTION

Il est limité, à priori, en égard à la disparition rapide des anticorps après une atteinte; il ne faut donc pas s'attendre à trouver dans une population des titres résiduels qui permettent de préjuger de son immunité globale. Le fait est illustré par l'enquête sérologique pratiquée sur les sérums des sujets dits « tout-venants » (voir p. 56). Parallèlement, nous avons pratiqué une enquête analogue sur les sérums d'enfants de 0 à 15 ans. Ceux-ci comprenaient deux catégories de sujets :

La première concernait 119 enfants hospitalisés dans les Hospices Civils de Lyon (Services des Professeurs JEUNE et BERNHEIM), dont 45 pour affections diverses sans rapport avec la grippe, et 74 pour lesquels ce diagnostic pouvait être évoqué : 3 sujets seulement avaient des anticorps sériques et à un titre inférieur au 1/16, tous les autres donnant une fixation nulle.

La deuxième concernait 48 enfants hospitalisés dans les Hospices Civils de la région de MONTPELLIER (Service du Professeur CHAPTAL) dont 16 pour affections diverses et 32 suspects de grippe : 2 sujets seulement montrèrent une fixation positive, dont l'un à un titre du 1/32, l'autre à un titre du 1/128; tous deux furent retenus comme atteints de grippe authentique.

Ainsi, la réaction de fixation du complément ne saurait présenter un intérêt immunologique que dans la période qui suit immédiatement l'extinction d'une épidémie.

COMPARAISON DE NOS RESULTATS AVEC CEUX PUBLIES PAR D'AUTRES AUTEURS

La relative impermanence de l'élévation du titre des anticorps fixant le complément est soulignée par les auteurs : FRANCIS et coll. (1937), MARTIN (1940), RICKARD et coll. (1940), HOYLE et FAIRBROTHER (1947) et, plus récemment, HARRIS et coll. (1954), admettent

qu'une diminution rapide de ces anticorps est constatée dans les 3 à 6 mois après une épidémie et qu'« en un an, tous les titres sont revenus à leur valeur normale » (FAIRBROTHER et MARTIN, 1938).

Les statistiques de ces auteurs mettent en évidence la rareté des titres élevés dans les sérums des sujets en dehors d'une épidémie. Ainsi, HOYLE et FAIRBROTHER (1947) sur 1.562 sérums testés avec un antigène A obtiennent 1.453 titres inférieurs au 1/8, 92 au 1/8, 14 au 1/16 et 3 au 1/32. Pour la grippe B, les résultats sont semblables, l'incidence des titres supérieurs ou égaux au 1/16 n'excédant pas 1 % des cas (0,53 % dans notre statistique).

En revanche, pour 138 sérums de convalescents, ils trouvent le test positif dans 95 % des cas, 64 % atteignant ou dépassant le 1/16. Pour la grippe B, épidémique, FARKAS et DOMOK (1954) trouvent, pour 1.140 adultes suspects de grippe, 129 réactions au 1/16, 103 au 1/32, 350 au 1/64, 63 au 1/128, 28 au 1/256 et 13 au 1/512, soit un peu plus de 60 % supérieures ou égales au 1/16. Pour 64 enfants de 2 à 10 ans, la répartition était identique, mais pour 152 enfants de moins de 2 ans, 12 seulement furent positifs au delà du 1/8, le titre maximum étant le 1/64. En particulier, chez un enfant à partir duquel fut isolée une souche de virus B, le titre s'éleva seulement 2 mois après la maladie, lorsqu'il eut atteint l'âge de 7 mois. De tels faits ont été signalés également par ANDERSON et coll. (1953). Cette incapacité relative des jeunes enfants à réagir à l'infection par une élévation du titre des anticorps pourrait expliquer la rareté des réactions positives dans notre statistique portant sur les enfants de 0 à 15 ans de MONTPELLIER, rareté qui contraste avec la découverte parmi eux de 2 cas authentiques de grippe.

La plupart des auteurs admettent, en conclusion, que le titre du 1/16 est pratiquement toujours significatif d'une infection récente.

Cependant, certains auteurs obtiennent des résultats légèrement différents :

SIMROCK et coll. (1953) admettent comme significatif le titre du 1/40 ++++ mais précisent que ce titre est exigible de la 3^e à la 4^e semaine qui suit le début de la maladie, des titres du 1/10 au 1/20 ayant quelque valeur de présomption dans la première quinzaine. Surtout, ils utilisent pour leurs réactions un antigène viral purifié et des liquides allantoïques bruts, reconnaissant eux-mêmes que, de ce fait, leurs résultats ne peuvent être comparés avec ceux de HOYLE. En ce qui concerne la sensibilité de leur réaction, ils concluent que l'emploi des antigènes viraux expose aux mêmes déboires que la réaction de HIRST.

De même les conclusions de TERZIN et coll. (1954) sont différentes, puisque, utilisant des antigènes solubles, ils considèrent comme significatif un titre du 1/64 ; ils s'appuient sur le fait que, sur 498 sujets atteints d'infections « autres que la grippe », 101 at-

teignent le 1/16 et 42 entre le 1/32 et le 1/64 ; mais ils précisent que ces sujets « témoins » ont été testés à une époque où sévissait une épidémie de grippe, conditions évidemment éloignées de celles requises par les autres auteurs pour l'établissement du titre significatif.

ETUDE COMPAREE DE LA REACTION DE FIXATION DU COMPLEMENT ET DE LA REACTION D'INHIBITION DE L'HEMAGGLUTINATION

A. - Fidélité.

Nous avons montré que la FDC permet le diagnostic par l'examen d'un seul sérum, alors que le HIRST exige impérieusement l'examen de deux sérums. Le titre absolu fourni par cette réaction varie, en effet, dans de très larges limites en fonction de l'antigène utilisé et pour un même antigène, d'un test à l'autre ; bien que n'employant pas cette réaction à des fins diagnostiques, nous l'avons pratiquée sur quelques sérums au début de l'épidémie de 1953, où nous n'avions pas encore isolé la souche PEN, afin de connaître, par un test indirect, le type de la souche en cause. Par la suite, lorsque cette souche fut isolée, nous avons pu tester ces sérums avec cette souche homologue. Nous donnerons les résultats obtenus pour 3 paires de sérums testés plusieurs fois, à plusieurs jours d'intervalle (colonnes 1, 2, 3), avec 3 antigènes du type FM1 mais d'origine différente (I : FM1 de la Faculté - II : FM1 de l'O.M.S. - III : FM1, souche d'épidémie PEN). Pour chaque sujet, le chiffre supérieur représente le titre du sérum précoce, l'inférieur celui du sérum tardif :

	TAR...			PETI...			Hoo..		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
1	0	256	—	0	32	—	—	256	—
	80	5096	—	8	2048	—	—	5096	—
2	0	16	—	0	8	—	—	16	—
	32	1024	—	64	256	—	—	2048	—
3	—	—	8	—	—	0	—	—	0
	—	—	64	—	—	64	—	—	128

Ces résultats illustrent la difficulté de retrouver le même titre pour le même sérum et, en outre, le fait que la souche d'épidémie peut parfois donner des résultats moins bons que les autres.

A l'opposé, pour la réaction de fixation du complément, les titres des sérums de référence utilisés au laboratoire d'Hygiène, souvent pendant plusieurs mois, font preuve d'une remarquable fixité, et ce n'est qu'après une longue conservation que l'on voit ce titre fléchir.

— Sérums humains :

LAV., grippe A, testé 5 fois du 22-3-55 au 20-4-55, a titré 4 fois 512, 1 fois 256 (512++).

MAL., grippe A, testé 13 fois du 27-4-55 au 2-9-55, a titré 2 fois 512, 9 fois 256, 2 fois 128.

CHE., grippe B, testé 12 fois du 27-4-55 au 2-9-55, a titré 2 fois 512, 9 fois 256, 1 fois 128.

— Sérums animaux :

Cobaye 62, témoin B, testé 6 fois du 6-10-54 au 28-4-55, a titré 1 fois 1.024, 5 fois 512.

Cobaye 61, témoin B, testé 19 fois du 13-10-54 au 7-4-55, a titré 1 fois 1.024, 12 fois 512, 5 fois 256, 1 fois 64.

B. - Sensibilité.

Nous avons déjà fait remarquer que la réaction de HIRST présente l'inconvénient d'exiger la mise en œuvre de plusieurs antigènes si l'on veut avoir des chances de détecter le maximum de positivités. La réaction de fixation du complément, par contre, permet d'atteindre ce résultat par le jeu de deux antigènes solubles A et B.

Même dans ces conditions, la première se révèle, à l'usage, moins sensible que la seconde :

a) *Nombre de sérums positifs détectés :*

Sur 92 cas reconnus positifs par les deux méthodes, STUART-HARRIS (1953) a constaté la supériorité de la FDC :

	HIRST	FDC
— Positifs	54	67
— Négatifs	38	25 (dont 4 cas positifs par le HIRST)

De même, HOYLE et FAIRBROTHER (1947), en prenant une élévation du titre de 1 à 4 comme critère de positivité, comparent les résultats obtenus par les deux méthodes ; ils utilisent 2 antigènes pour la FDC et 6 pour le HIRST. Sur 18 sérums trouvés positifs par les deux méthodes, le HIRST révèle 13 réactions positives par la souche la plus sensible, les autres en détectant de 8 à 12 ; la FDC donne 16 réponses positives.

b) *Amplitude de l'élévation du titre :*

Les variations du titre se révèlent, dans la même étude, plus marquées pour la FDC que pour le HIRST ; comparant, pour ces 18 paires de sérums, les titres réciproques des deux échantillons, ils trouvent :

	× 128	× 64	× 32	× 16	× 8	× 4	× 2	× 0
FDC	4	2	2	4	2	2	1	1
HIRST (1)	1	1	3	0	4	3	4	2

(1) Souche SWINE, donnant les résultats les plus favorables.

Ainsi, par une fidélité et une sensibilité supérieures, la réaction de fixation du complément se révèle un instrument de diagnostic supérieur à la réaction d'inhibition de l'hémagglutination.

C. - Spécificité.

En revanche, la spécificité étroite de cette dernière méthode en fait un instrument irremplaçable pour une étude épidémiologique, par les renseignements qu'elle apporte sur le type du virus en cause et le mode de propagation des épidémies.

De même, elle est supérieure à la FDC pour une étude immunologique.

CHAPITRE V

AUTRES MÉTHODES BIOLOGIQUES DE DIAGNOSTIC

A. - Autres méthodes sérologiques : Méthodes rapides.

L'inconvénient des méthodes classiques (culture sur œuf, réactions de fixation du complément et de HIRST) est de ne fournir de réponse qu'avec un délai de plusieurs jours.

Aussi, certains chercheurs se sont ingéniés à mettre à profit la présence du virus dans les voies respiratoires supérieures des malades dès les premiers stades de l'infection, en essayant de concentrer le virus à partir des liquides de lavage, puis de s'en servir comme antigènes dans des réactions sérologiques en présence de sérums de référence. Cette concentration est obtenue soit par centrifugation à grande vitesse des liquides de lavage, soit par absorption du virus sur des hématies, suivie d'élution et resuspension.

WOLFF (1954) introduit cet « antigène » dans 2 types de réactions :

- Une réaction de fixation du complément.

- Une réaction d'absorption spécifique entre le virus et les anticorps d'un sérum de référence, la preuve de la présence du virus étant apportée par la baisse du titre de ce sérum à la fin de l'épreuve (appréciée par un HIRST classique).

Avant lui, KALTER (1950) s'inspirant du même principe, introduisait le virus élué comme « antigène » dans une réaction de HIRST simplifiée.

Comme on peut s'y attendre, la sensibilité de telles méthodes est faible, voisine de celle de la méthode d'isolement sur œuf : elle ne saurait donc constituer un moyen sûr de diagnostic courant. En revanche, les promoteurs de ces méthodes ont pensé qu'elles pourraient constituer un moyen rapide pour apporter la preuve de l'étiologie grippale d'une épidémie dès son début, et pour déterminer le type du virus en cause.

Malheureusement, outre leur défaut de sensibilité, ces méthodes sont grevées d'un pourcentage élevé de réponses positives non spécifiques qui ne permettent pas, sauf à perfectionner les techniques, d'accorder un crédit à leurs résultats.

B. - Méthodes non spécifiques : Méthode cytologique.

Décrite par PANTHIER, CATEIGNE et HANNOUN (1948), cette méthode, non spécifique contrairement aux précédentes, permet, en leur absence, d'établir un diagnostic sur la présomption qui résulte de l'examen microscopique. On inocule des souris avec le gargarisme et on les sacrifie après 24, 48, 72 heures. On pratique alors, après dissection, un lavage soigneux à la seringue, des trachées de ces souris. Le liquide, étalé sur lame et coloré par la technique de MACCHIAVELLO (1937) présente, à l'examen microscopique avec un fort grossissement, une formule cytologique caractéristique : les cellules trachéales normales font place, en 24 à 48 heures, à des cellules pathologiques typiques résultant de la nécrose et de la desquamation de l'épithélium trachéal, déformées par des vacuoles et dont le noyau est excentré. Quelques polynucléaires apparaissent pour devenir très nombreux après 72 heures, en même temps que se multiplient, à l'intérieur des vacuoles, des corpuscules intensément colorés, à la limite de la visibilité.

Après 72 heures, la formule cytologique revient à la normale par disparition progressive des polynucléaires et des cellules grippales et réapparition exclusive des cellules normales de l'épithélium trachéal.

CONCLUSIONS

Après un chapitre préliminaire exposant les conceptions actuelles sur la grippe, telles qu'elles se dégagent des travaux les plus récents et rappelant les difficultés rencontrées, si l'on se réfère aux seules données cliniques et épidémiologiques, pour affirmer qu'un ultra-virus grippal est en cause, nous nous sommes proposé d'examiner dans quelle mesure les méthodes biologiques permettent de pallier ces difficultés.

La méthode directe d'isolement du virus grippal a fait l'objet d'une étude personnelle sur les conditions techniques de prélèvement des produits pathologiques ayant présidé à quinze tentatives d'isolement au laboratoire d'Hygiène. Nous avons ensuite décrit les techniques d'inoculation à l'animal sensible et à l'œuf de poule incubé, et les conditions de développement de quatre souches isolées à Lyon. Nous terminons ce chapitre par un exposé des méthodes d'identification des souches ainsi isolées.

Nos recherches ont ensuite porté sur les méthodes indirectes sérologiques. La réaction d'inhibition de l'héماغglutination exigeait une étude préalable des héماغglutinines grippales. Nous avons montré comment on pouvait les obtenir, les titrer, les concentrer et les conserver. Procédant à l'étude de la réaction d'inhibition de l'héماغglutination, nous avons insisté sur les facteurs non spécifiques qui peuvent interférer sur le phénomène de l'héماغglutination et son inhibition par les anticorps spécifiques, rendant sa pratique courante malaisée pour le diagnostic.

L'étude de la réaction de fixation du complément nous a amené à celle de la préparation des antigènes spécifiques. Nous avons ensuite exposé les modalités de la réaction, en particulier une technique inédite adoptée au laboratoire d'Hygiène, particulièrement économique. La valeur pratique de la méthode a été appréciée par une étude portant sur un millier de réactions effectuées à propos de deux épidémies survenues dans la région lyonnaise en 1953 et 1955. Définissant les critères de positivité de la réaction, nous avons illustré, par la présentation de quelques observations retenues comme

les plus typiques, les difficultés du diagnostic par les données cliniques et montré comment la réaction permet de les résoudre, compte tenu de ses possibilités et de ses limites.

Sur le plan épidémiologique, la réaction nous a permis d'opposer l'épidémie de 1953 à l'endémo-épidémie de 1955 et, pour celle-ci, d'éclaircir certaines particularités de propagation.

Une étude comparée de la réaction de fixation du complément et de la réaction d'inhibition de l'hémagglutination a fait apparaître sur le plan pratique les inconvénients théoriques de cette dernière, et la supériorité de la première qui, plus fidèle et plus précise, peut, en outre, donner, par l'examen d'un seul sérum, des indications utiles pour un diagnostic. En revanche, la réaction d'inhibition trouve des indications dans l'incapacité de la réaction de fixation du complément à résoudre certains problèmes épidémiologiques et immunologiques, quelques méthodes accessoires pouvant apporter, dans des cas particuliers, des renseignements supplémentaires.

En conséquence, la réaction de fixation du complément paraît constituer, actuellement, la méthode de choix pour le diagnostic au laboratoire de la grippe.

Vu :

Le Doyen,

Le Président de la Thèse :

H. HERMANN.

SOHIER.

Vu et permis d'imprimer

Lyon, le 4 novembre 1955

Le Recteur, Président du Conseil de l'Université,

André ALLIX.

BIBLIOGRAPHIE SOMMAIRE

On ne saurait prétendre, dans le cadre d'un tel travail, citer tous les travaux publiés sur la grippe. Nous avons donc limité cet index bibliographique aux ouvrages et publications effectivement consultés pour cette étude et aux publications comportant une étude d'ensemble. On trouvera une bibliographie très complète jusqu'en 1948 dans l'ouvrage de Van Rooyen C.-E. et Rhodes A.-J : *Virus diseases of man*, New-York 1949, 561-687, ainsi que dans celui de Levaditi C. et Lépine P., *Les ultra-virus des maladies humaines*, Paris, 1948, 1247-1300. Après 1948, on se référera aux articles de Cateigne dans « La Presse Médicale », et surtout aux substantielles bibliographies apportées par le Bulletin de l'O.M.S., 1953, 8, 591-824, et l'excellente monographie publiée par Stuart-Harris C.-H. à Londres : *Influenza and other virus infections of the respiratory tract*, Arnold éditeur, 1953.

ANDERSON S.-G. *Austr. J. exp. a. Med. Sci.*, 1948, 26, 347.

ANDERSON S.-G., DONNELLEY M., FRENCH E.-L., KALRA S.-L., WHITE J. : *Med. J. Austral.*, 1953, 2, 44.

ANDREWES C.-H. *New Engl. J. Med.*, 1950, 242, 197.

ANDREWES C.-H., *Bul. World Hlth Org.*, 1953, 8, 595.

ARCHETTI I. et HORSFALL F.-J, Jr : *J. Exper. Med.* 1950, 92, 441.

ARCHETTI I., *Proc. Soc. Exper. Biol.*, N.-Y. 1952, 80, 212.

BEVERIDGE W.-I.-B. et BURNET F.-M., *Med. Res. Coun. Spc. Rep.*, 1946, N° 256.

BEVERIDGE W.-I.-B. et LIND P.E. *Austr. J. exp. Biol. a. Med. Sci.* 1946, 24, 127.

BOERNER F. et LUKENS M. *Amer. J. clin. Pathol.*, 1937, 7, 33.

BORDET J. *Traité de l'Immunité*. Masson, édit. Paris, 1939.

BORDET P., QUERSIN-THIRY L. *Ann. Inst. Pasteur Fr.*, 1953a, 84, 695.
Bul. Acad. R. Méd. Belg. 1953b, 18, 398.

BOUCHER H., BERTEIN J. et VAILHE J. *Pres. Méd.*, 1951, 59, 1700.

BURNET F.-M. *Austral. J. Exp. Biol.*, 1940, 18, 353.

- BURNET F.-M. *Proc. Roy. Soc. Ser. B*, 1951, 138, 890.
- BURNET F.-M. et LIND P.-E. *J. Gen. Microbiol.* 1951, 5, 59.
- BURNET F.-M., Mc CREA J.-F. et STONE J.-D. *Brit J. exp.* 1946 a, 27, 228.
- BURNET F.-M., STONE J.-D., et ANDERSON S.-G. *Lancet*, 1946 b, 1, 807.
- BURNET F.-M., Mc CREA J.-F. et ANDERSON S.-G. *Nature*, 1947, 160, 404.
- BURNET F.-M., FRASER K.-B. et LIND P. E. *Nature*, Lond., 1953, 171, 163.
- CATEIGNE G., EYQUEM A., HANNOUN C. *Pres. Méd.* 1950a, 58, 438.
- CATEIGNE G., HANNOUN C., MARQUEZY R.-D., DEBRAY P. *Sem. Hôp. Paris*, 1950b, 26, 2519.
- CATEIGNE G., FAUCONNIER B. et HANNOUN C. *Sem. Hôp. Paris*, 1953, 29, 102.
- COLLIER F.-C., REICH A. et KING J.-W. *J. Lab. clin. Med. U.S.A.* 1952, 39, 778.
- COMANDINI U. *Boll. Ist. Sierotherap. Milanese* :
— 1952a, 31, 353.
— 1952b, 31, 463.
- Comité d'Experts sur la Grippe. (Org. Mond. de la Santé) : *Rapport de la première session*, sept. 1952.
- Commission on Acute Respiratory Diseases : *Proc. Soc. exp. Biol. a. Med.* 1946, 62, 118.
- Commission on Acute Respiratory Diseases : *Amer. J. Hyg.* 1948, 48, 263.
- COX H.-R., SCHEER J., VAN AISTON S. et BONHEL E.-J. *Immunol.* 1947, 56, 149.
- ESSER-TRIMBERGER I. *Thèse*, Lyon, 1952.
- EYQUEM A., CATEIGNE G., HANNOUN C., FAUCONNIER B. *Sem. Hôp. Paris*, 1953, 29, 1.
- FAIRBROTHER R.-W. et MARTIN A.-E. *Lancet*, 1938, 1, 718.
- FARKAS E. et DOMOK I. *Acta Microbiol. Acad. Scienc. Hung.* 1954, tome I, 4, 471.
- FAUCONNIER B. *Ann. Inst. Pasteur Fr.*, 1953, 84, 474.
- FRANCIS T. Jr, MAGILL T.-P., RICKARD E.-R. et BECK M.-D. *Amer. J. Publ. Hlth.* 1937, 27, 1141.
- FRANCIS T., SALK J.-E., QUILLIGAN J.-J. *Amer. J. Publ. Hlth.*, 1947, 37, 1013.
- FRANCIS T. *J. exp Med.* 1947, 85, 1.
- FRANCIS T. et MINUSE E. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 1948, 69, 291.
- FRIEDEWALD W.-F. *J. exp. Med.*, 1943, 78, 347.
- FLORMAN A.-L. *J. Bacteriol.* 1946, 52, 307.
- FULTON F. et DUMBELL K.-R. *J. Gen. Microbiol.* 1949, 3, 97.
- GORDON J.-E. in « *Tomorrow's Horizon in Public Health* ». Publ. Hlth Ass. of New-York City, édit., New-York, 1950.
- HENLE G. et HENLE W. *Science*, 1943, 98, 87.

- HENLE G. et HENLE W. *J. exp. Med.* 1949, 90, 1.
- HILLEMANN M.-R., MASON R.-P. et BUESCHER E.-L. *Proc. Soc. exp. Biol. N.-Y.* 1950, 75, 829.
- HILLEMANN M.-R., WERNER J.-H., GAULD R.-L. *Bull. World Hlth Org.* 1953, 8, 613.
- HIMMELWEIT F. *Nature*, 1949, 164, 650.
- HIRST G.-K. *Science*. 1941, 94, 22.
- HIRST G.-K. *J. Immunol.* 1942, 45, 293.
- HIRST G.-K. *J. exp. Med.* 1948, 87, 301.
- HOYGAARD A. *Lancet*. 1939, 1, 245.
- HOYLE L. et FAIRBROTHER R.-W. *J. Hyg. Cambridge*, 1937, 37, 512.
- HOYLE L. *Mon. Bull. Minist. Hlth Lab. Serv.*, 1944, 3, 58.
- HOYLE L. *J. of Hyg. Cambridge*, 1945, 44, 170.
- HOYLE L. et FAIRBROTHER R.-W. *Brit. Med. Bull.* 1947, 2, 991.
- HOYLE L. *Mon. Bull. Minist. Hlth Lab. Serv.* 1948a, 5, 114.
- HOYLE L. *Brit. J. exp. Path.* 1948b, 29, 390.
- HOYLE L. *J. of Hyg.* 1953a, 52, 180.
- HOYLE L. *The nature of virus multiplication*, p. 255, Cambridge University Press, 1953b.
- ISAACS A., GLEDHILL A.-W. et ANDREWES C.-H. *World Hlth Org. Bull.*, 1952, 6, 287.
- JEUNE M. et GALY P. *Pédiatrie*, 1950, 5, 42.
- JEUNE M. et BETHENOD M. *Rev. du Prat.*, 1954, 4, 1471.
- KALTER S.-S. *Proc. Soc. exp. Biol. N.-Y.*, 1950, 74, 607.
- KNIGHT C.-A. *J. exp. Med.*, 1946, 83, 11.
- KOPROWSKY H. *Amer. New-York Acad. Sci.*, 1952, 54, 963.
- LEBRUN J. et DELAUNAY A. *Pres. Med.*, 1954, 62, 941.
- LE DEN R. *Laryngites et hypolaryngites grippales chez le jeune enfant.* Thèse, Bordeaux, 1951-52.
- LENNETTE E.-H. et HORSFALL F.-L. Jr. *J. exp. Med.*, 1940, 72, 233.
- LENNETTE E.-H. et HORSFALL F.-L. Jr. *J. exp. Med.* 1941, 73, 581.
- LÉPINE P., SAUTER V., REINIE L., MAURIN J. *Ann. Inst. Pasteur Fr.*, 1949, 77, 108.
- LÉPINE P., SAUTTER V., DELPY J. et ARTZET F. *Ann. Inst. Pasteur Fr.* 1953, 84, 684.
- LÉPINE P. et SOHIER R. *Méthodes de laboratoire appliquées au diagnostic des maladies à virus.* Masson & C^{ie}, édit., Paris, 1954.
- MACHIAVELLO A. *Rev. Chil. Hig.*, 1937, 1, 101.
- MC CLELLAND L. et HARE R. *Canad. J. Publ. Hlth*, 1941, 32, 530.

- MC CREA J.-F. *Austral. J. exp. Biol. a. Med. Sci.*, 1946, 24, 283.
- MC CREA J.-F. *Austral. J. exp. Biol. a. Med. Sci.*, 1948a, 26, 345.
1948b, 26, 355.
- MAGNUS (VON). *Proc. IV^e Congrès Internat. Microbiol. Copenhague*, 1947, p. 300.
- MAGNUS (VON). *Bull. World Hlth Org.*, 1953, 8, 647.
- MARQUEZY R.-A. et BACH C. *Sem. Hôp. Paris*, 1953, 29, pp. 109 et 119.
- MARTIN A.-E. *J. Hyg. Cambridge*, 1940, 40, 104.
- MULDER J. et STUART-HARRIS C.-H. *Bull. World Hlth Org.*, 1953, 8, 743.
- NIGG C., CROWLEY J.-H. et WILSON D. *Science*, 1940, 91, 603.
- PANTHIER R., CATEIGNE G. et HANNOUN C. *Ann. Inst. Pasteur Fr.*, 1948, 75, 338.
- PEILLARD M.-M., SOHIER R. et GINESTE J. *Ann. Inst. Pasteur Fr.*, 1955, 88, 446.
- PONTECORVO M. *Riv. Siero. Ital.*, 1953, 28, 271.
- RAYBAUD A., BADETTI L. et CASTERET. *Bull. Mem. Soc. méd. Hôp. Paris*. 1953, 69, 375.
- RICKARD E.-R., LENNETTE E.-H. et HORSFALL F.-L. *Publ. Hlth Rep. Wash.*, 1940, 55, 2146.
- SALK J.-E. *J. Immunol.*, 1944, 49, 87.
- SALK J.-E., HENLE G. et FRANCIS T.-H. *Amer. J. Hyg.*, 1945, 42, 57.
- SALK J.-E. *Science*, 1948, 108, 749.
- SAUTTER V. et LÉPINE P. *Ann. Inst. Pasteur Fr.*, 1948, 74, 261.
- SCHER J.-M. et JARUSZEWSKI E. *Arch. Int. Med. U.S.A.*, 1952, 90, 201.
- SHOPE R.-E. *J. Exper. Med.*, 1941, 74, 49.
- SIMROCK W., HAUSSMANN H.-G. et SIEGERT R. *Zeitsch. f. Hyg.*, 1953, 136, 617.
- SMITH W., ANDREWES C.-H. et LAIDLAW P.-P. *Lancet*, 1933, 2, 66.
- SMITH W. *Lancet*, 1936, 2, 1256.
- SOHIER R. *Rev. Hyg. et Méd. Soc.*, 1954a, 2, 699.
- SOHIER R. *Rev. Lyon. de Méd.*, 1954b, 485.
- STUART-HARRIS C.-H. et MILLER M.-M. *Brit. J. Exper. Path.*, 1947, 28, 394.
- STUART-HARRIS C.-H., GNESH G.-M. et GORDON I. *J. of Hyg. Cambridge, tory tract. Monographie*, E. Arnold, édit., 1953.
- STUART-HARRIS C.-H., GNESH G.-M. et GORDON I. *J. of Hyg. Cambridge*, 1954, 52, 211.
- TAMM L., KILBOURNE E.-D. et HORSFALL F.-L. Jr. *Proc. Soc. Exper. Biol. N.-Y.*, 1950, 75, 89.
- TERZIN A.-L., BORDJOSKI M.-N., MILOVANOVIC M.-V., STOJKOVIC Lj.-V. et DIMIK M.-M. *J. of Hyg.*, 1954, 52, 129.

- VAN DER VEEN S. et MULDER J. *Onderz. Meded. Inst. Praev. Geneesk.*, 1950, n° 6.
- VIEUCHANGE J., SAUTTER V. et REINIE L. *Bull. Acad. Méd.*, 1947, 131, 76.
- WADDY B.-B. *Lancet*, 1952, 6736, 674.
- WEIL M.-L., BEARD D. et BEARD J.-W. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 1948, 68, 308.
- WOLFF H.-L. *Thèse*, 1954, Kemink, édit., Utrecht.
- WYCKOFF R.-W.-G. *Nature*, Lond, 1951, 168, 651.
- WYCKOFF R.-W.-G. *J. Immunol.*, 1953, 70, 187.
-

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	11
HISTORIQUE	13
CHAPITRE PREMIER. — CONCEPTIONS ACTUELLES SUR LA GRIPPE.	15
La grippe, entité clinique ?	15
La grippe, entité épidémiologique ?	18
CHAPITRE II. — MÉTHODES DIRECTES DE DIAGNOSTIC SPÉCIFIQUE :	23
ISOLEMENT DU VIRUS.	
Prélèvement des produits pathologiques	23
Inoculation	29
Preuves de la présence du virus	32
Identification des souches	32
Valeur et intérêt de la méthode	33
CHAPITRE III. — MÉTHODES INDIRECTES DE DIAGNOSTIC SPÉCIFIQUE :	34
RÉACTION D'INHIBITION DE L'ÉMAGGLUTINATION.	
Le phénomène d'hémagglutination	34
La réaction d'inhibition de l'hémagglutination	37
CHAPITRE IV. — MÉTHODES INDIRECTES DE DIAGNOSTIC SPÉCIFIQUE :	41
RÉACTION DE FIXATION DU COMPLÉMENT.	
Préparation des antigènes	41
Technique de la réaction	42
Intérêt diagnostique de la réaction	52
I. Critères de positivité de la réaction :	
A) Observations en deux temps	53
B) Observations en un temps. (Titre significatif) ..	54
C) Intérêt du titre significatif	60

II. Application à deux épidémies :	
A) Insuffisance des seules données cliniques	60
B) Valeur diagnostique de la réaction	66
1. Sensibilité	66
2. Spécificité	68
Intérêt épidémiologique de la réaction	71
I. Déroulement chronologique de deux épidémies	71
II. Apport de la réaction à une étude épidémiologique	73
A) Renseignements fournis par l'étude des courbes de morbidité et intérêt de la réaction	78
B) Bilan des épidémies et essai d'interprétation ..	79
Intérêt immunologique de la réaction	80
Comparaison avec les résultats publiés	80
Etude comparée de la réaction de fixation du complément et de la réaction d'inhibition de l'hémagglutination	82
A) Fidélité	82
B) Sensibilité	83
C) Spécificité	84
CHAPITRE V. — AUTRES MÉTHODES BIOLOGIQUES DE DIAGNOSTIC.	85
A) Méthodes sérologiques rapides	85
B) Méthode cytologique	86
CONCLUSIONS	87
BIBLIOGRAPHIE	89
